

**José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)**

Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 3

Atena
Editora
Ano 2019

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 3

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Natália Sandrini
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof^a Dr^a Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof.^a Dr.^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof.^a Dr.^a Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof.^a Dr.^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.^a Dr.^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof.^a Dr.^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof.^a Dr.^a Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof.^a Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.^a Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
A532	Análise crítica das ciências biológicas e da natureza 3 [recurso eletrônico] / Organizador José Max Barbosa de Oliveira Junior. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza; v. 3) Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-359-0 DOI 10.22533/at.ed.590192705 1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Série. CDD 610.72
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com 96 capítulos apresenta uma visão holística e integrada da grande área das Ciências Biológicas e da Natureza, com produção de conhecimento que permeiam as mais distintas temáticas dessas grandes áreas.

Os 96 capítulos do livro trazem conhecimentos relevantes para toda comunidade acadêmico-científica e sociedade civil, auxiliando no entendimento do meio ambiente em geral (físico, biológico e antrópico), suprimindo lacunas que possam hoje existir e contribuindo para que os profissionais tenham uma visão holística e possam atuar em diferentes regiões do Brasil e do mundo. As estudos que integram a *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* demonstram que tanto as Ciências Biológicas como da Natureza (principalmente química, física e biologia) e suas tecnologias são fundamentais para promoção do desenvolvimento de saberes, competências e habilidades para a investigação, observação, interpretação e divulgação/interação social no ensino de ciências (biológicas e da natureza) sob pilares do desenvolvimento social e da sustentabilidade, na perspectiva de saberes multi e interdisciplinares.

Em suma, convidamos todos os leitores a aproveitarem as relevantes informações que o livro traz, e que, o mesmo possa atuar como um veículo adequado para difundir e ampliar o conhecimento em Ciências Biológicas e da Natureza, com base nos resultados aqui dispostos.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
INIBIÇÃO DA PEÇONHA DE <i>Bothrops alternatus</i> (URUTU) 'IN VIVO' PELO PRINCÍPIO ATIVO ISOLADO VEGETAL LUPEOL	
Benedito Matheus dos Santos Klaus Casaro Saturnino Vanderlúcia Fonseca de Paula Mirian Machado Mendes	
DOI 10.22533/at.ed.5901927051	
CAPÍTULO 2	7
INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TÓXICA, ANTIDIARREICA E ANTIESPASMÓDICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>SIDA RHOMBIFOLIA</i> L. (MALVACEAE)	
Rafael Lima Marinho Paiva Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Rayane Fernandes Pessoa Indyra Alencar Duarte Figueiredo Sarah Rebeca Dantas Ferreira Otemberg Souza Chaves Micaelly da Silva Oliveira Maria de Fátima Vanderlei de Souza Fabiana de Andrade Cavalcante	
DOI 10.22533/at.ed.5901927052	
CAPÍTULO 3	22
INVESTIGAÇÃO DE LECTINA E INIBIDOR DE TRIPSINA EM TUBÉRCULOS DE INHAME (<i>Dioscorea alata</i>) CULTIVADO NO NORDESTE DO BRASIL	
Julia Mariano Caju de Oliveira Edilza Silva do Nascimento Tatiane Santi Gadelha Carlos Alberto de Almeida Gadelha	
DOI 10.22533/at.ed.5901927053	
CAPÍTULO 4	38
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ALERGÊNICOS ENCONTRADOS EM PEÇAS ANATÔMICAS HUMANAS CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO	
Hércules Gonçalves de Almeida Medeiros Adna Cristina Barbosa de Sousa	
DOI 10.22533/at.ed.5901927054	
CAPÍTULO 5	50
MEIO AMBIENTE GENÉTICO E EMBRIÕES EXCEDENTÁRIOS	
Odair Bufolo Daiane Silva Berdusco Freire Andréia de Fátima Selvati Bredariol	
DOI 10.22533/at.ed.5901927055	

CAPÍTULO 6 62

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS PROPANOICO E ACÉTICO POR PROPIONIBACTERIUM ACIDIPROPIONICI ADSORVIDA EM MONTMORILONITA K-10

Taciani do Santos Bella de Jesus
Lucidio Cristovão Fardelone
Gustavo Paim Valença
José Roberto Nunhez
José Augusto Rosário Rodrigues
Paulo José Samenho Moran

DOI 10.22533/at.ed.5901927056

CAPÍTULO 7 72

PRODUÇÃO DE B-GLUCANASES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E REDUÇÃO DE BIOFILME DE *Candida albicans*

Glaucia Hollaender Braun
Henrique Pereira Ramos
Maria Laura Lucas Natal
Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

DOI 10.22533/at.ed.5901927057

CAPÍTULO 8 80

PRODUCTION AND STABILITY OF LIPASE AND PECTINASE PRESENT IN AGROINDUSTRIAL RESIDUES

Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome
Carlos Eduardo de Araújo Padilha
Murilo Ricardo do Nascimento Arrais
Maria Cecília Bezerra Caldas
Everaldo Silvino dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.5901927058

CAPÍTULO 9 84

PROPRIEDADES FÍSICAS E MECÂNICAS DE UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO APÓS ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂

Luis Eduardo Genaro
Luana Mafra Marti
Ana Carolina Bosco Mendes
Rafael Amorim Martins
Angela Cristina Cilense Zuanon

DOI 10.22533/at.ed.5901927059

CAPÍTULO 10 91

PURIFICATION OF A XYLANASE FROM *Penicillium crustosum* AND ITS POTENTIAL USE IN CLARIFYING FRUIT JUICE

Jaina Caroline Lunkes
Vanessa Cristina Arfelli
Jorge William Fischdick Bittencourt
Rafael Andrade Menolli
Alexandre Maller
Jose Luís da Conceição Silva
Rita de Cássia Garcia Simão
Marina Kimiko Kadowaki

DOI 10.22533/at.ed.59019270510

CAPÍTULO 11 101

SENSIBILIDADE CELULAR E DE BIOFILME DE *Enterococcus* sp. AOS DESINFETANTES DE USO INDUSTRIAL

Luciana Furlaneto Maia
Naieli Mücke
Márcia Regina Terra
Danielle Karine Ohashi
Talita Butzske Bússolo
Márcia Cristina Furlaneto

DOI 10.22533/at.ed.59019270511

CAPÍTULO 12 115

SIMULAÇÃO NUMÉRICA DA PROPAGAÇÃO DE ONDAS CISALHANTES EM ROCHAS SEDIMENTARES A PARTIR DE IMAGENS MICROTOMOGRÁFICAS DE RAIOS X

Túlio Medeiros
José Agnelo Soares
Ronildo Otávio de Oliveira Neto
Juliana Targino Batista

DOI 10.22533/at.ed.59019270512

CAPÍTULO 13 127

STABILITY OF PECTINASE OF ASPERGILLUS NIGER IOC 4003 IN DIFFERENT SALTS FOR PURIFICATION IN BIPHASIC AQUEOUS SYSTEM

Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome
Murilo Ricardo do Nascimento Arrais
Carlos Eduardo de Araújo Padilha
Everaldo Silvino dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.59019270513

CAPÍTULO 14 131

TÉCNICA DE FISH APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE REATOR DE LODO ATIVADO UTILIZADO NA DEGRADAÇÃO DE BLENIDAS

Lívia Cordi
Nelson Durán

DOI 10.22533/at.ed.59019270514

CAPÍTULO 15 142

TEMPERATURE AND pH EFFECTS ON THE ACTIVITY AND STABILITY OF THR XYLANASES PRODUCED BY THE THERMOPHILIC FUNGUS *Rasamsonia emersonii* S10

Jéssica de Araujo Zandoni
Eleni Gomes
Gustavo O. Bonilla-Rodriguez

DOI 10.22533/at.ed.59019270515

CAPÍTULO 16 147

TRIAGEM DE TRATAMENTO DE *Luffa cylindrica* PARA IMOBILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* VISANDO A PRODUÇÃO DE INVERTASE

Beatriz Paes Silva
Brenda Kischkel
Nicolle Ramos dos Santos
André Álvares Monge Neto

DOI 10.22533/at.ed.59019270516

CAPÍTULO 17 159

AÇÃO FIBRINOLÍTICA DE PROTEASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES AMAZÔNICOS

Thayana Cruz de Souza
Anni Kelle Serrão de Lima
Michele Silva de Jesus
Raimundo Felipe da Cruz Filho
Wim Maurits Sylvain Degrave
Leila de Mendonça Lima
Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

DOI 10.22533/at.ed.59019270517

CAPÍTULO 18 164

ÁCIDO CÍTRICO: UM ENFOQUE MOLECULAR

Letícia Fernanda Bossa
Daniele Sartori

DOI 10.22533/at.ed.59019270518

CAPÍTULO 19 174

ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE MANGUEZAL E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Gabriela Xavier Schneider
Jean Carlos Ramos de Almeida
Kassiely Zamarchi
Débora Santos
Danyelle Stringari
Renata Rodrigues Gomes

DOI 10.22533/at.ed.59019270519

CAPÍTULO 20 188

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS COM A CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Juliana Barbosa Succar
Andressa Sbrano da Silva
Lidiane Coelho Berbert
Vinícius Ribeiro Flores
João Victor Rego Ferreira
Alexander Machado Cardoso
Ida Carolina Neves Direito

DOI 10.22533/at.ed.59019270520

CAPÍTULO 21 199

REABILITAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS PELA MINERAÇÃO DE QUARTZITO COM INSTALAÇÃO DE USINA SUSTENTÁVEL

Gabriel Silva Gomes

DOI 10.22533/at.ed.59019270521

CAPÍTULO 22	218
COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E TOXICIDADE DAS FOLHAS DE <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez (LAURACEAE)	
Viviane Mallmann	
Lucas Wagner Ribeiro Aragão	
Edineia Messias Martins Bartieres	
Valdeci José Pestana	
Shaline Séfara Lopes Fernandes	
Rogério César de Lara da Silva	
Tauane Catilza Lopes Fernandes	
Ana Francisca Gomes da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.59019270522	
CAPÍTULO 23	223
CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd. (Fabaceae) EM SUBSTRATOS ORGÂNICOS COMPOSTOS COM RESÍDUOS DE CASTANHA-DO-BRASIL	
Givanildo Sousa Gonçalves	
Lúcia Filgueiras Braga	
Letícia Queiroz de Souza Cunha	
DOI 10.22533/at.ed.59019270523	
CAPÍTULO 24	236
SUBSTRATOS ORGÂNICOS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd. (Fabaceae)	
Givanildo Sousa Gonçalves	
Lúcia Filgueiras Braga	
Letícia Queiroz de Souza Cunha	
DOI 10.22533/at.ed.59019270524	
SOBRE O ORGANIZADOR	253

TRIAGEM DE TRATAMENTO DE *Luffa cylindrica* PARA IMOBILIZAÇÃO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VISANDO A PRODUÇÃO DE INVERTASE

Beatriz Paes Silva

Universidade Estadual de Maringá, Bioquímica.
Maringá-PR

Brenda Kischkel

Universidade de São Paulo, Biologia.
São Paulo - SP

Nicolle Ramos dos Santos

Centro Universitário de Maringá, Engenharia química.
Maringá – PR

André Álvares Monge Neto

Universidade Estadual de Maringá.
Maringá-PR

RESUMO: A técnica de imobilização tem se tornado uma alternativa para processos industriais. A *Saccharomyces cerevisiae* sintetiza a enzima invertase, utilizada na indústria alimentícia para a produção de açúcar invertido, que é a matéria-prima que garante a textura adequada ao produto final. O presente trabalho objetivou a realização da triagem de quatro tratamentos para imobilização de *S. cerevisiae* sendo *Luffa cylindrica*, um bio-suporte, visando a produção de invertase. No primeiro lote de tratamento foi utilizada solução de hidróxido de sódio a 2% e mantido sob agitação a 120RPM por 24hs. O segundo lote foi autoclavado a 123°C a 1,3kgf/cm², já o terceiro lote foram aplicados ambos os tratamentos. O quarto lote foi utilizado para

controle. Os lotes foram inoculados com a levedura e fermentados com bicarbonato de sódio (0,15 mol/L) para a produção de invertase. A quantificação de microrganismos aderidos ao suporte foi realizada por contagem de câmara de Neubauer, a quantificação de proteínas foi realizada pela técnica de biureto e a medida da atividade de extrato bruto contendo invertase foi mensurada pela técnica de DNS. O segundo e o terceiro lote apresentaram resultados semelhantes ao controle com 0,95% de aderência de células à bucha. O primeiro lote apresentou 2,15 % de aderência das células e produziu enzimas com atividade de 0,6 mol.L⁻¹min⁻¹. Mesmo tendo um percentual de aderência bem menor (0,95%), as enzimas provenientes do tratamento controle apresentaram atividade 0,12 mol.L⁻¹min⁻¹, mostrando que esponja vegetal é um bom bio-suporte para imobilização dessa levedura mesmo sem tratamento.

PALAVRAS-CHAVE: *Saccharomyces cerevisiae*, bucha vegetal, imobilização, fermentação.

LUFFA CYLINDRICA TREATMENT TREATMENT FOR IMMOBILIZATION OF *Saccharomyces cerevisiae* AIMING THE INVERTASE PRODUCTION

ABSTRACT: The technique and immobilization

has become an alternative for industrial processes. *Saccharomyces cerevisiae* synthesizes the enzyme invertase, used in the food industry for the production of invert sugar, which is the raw material that guarantees the proper texture to the final product. The present work aimed at the triage of four treatments for immobilization of *S. cerevisiae*, being *Luffa cylindrica*, a biosupport, aiming the production of invertase. In the first batch of treatment 2% sodium hydroxide solution was used and kept under stirring at 120 RPM for 24 hours. The second batch was autoclaved at 123 ° C at 1.3 kgf/cm², and the third batch was applied to both treatments. The fourth lot was used to control it. The lots were inoculated with the yeast and fermented with sodium bicarbonate (0.15 mol / L) for the production of invertase. The quantification of microorganisms adhered to the support was performed by Neubauer chamber counting, the quantification of proteins was performed by the biuret technique and the measurement of the activity of crude extract containing invertase was measured by the DNS technique. The second and third batch presented similar results to the control with 0.95% adherence of cells to the bush. The first batch presented 2.15% cell adhesion and produced enzymes with activity of 0.6 mol.L⁻¹min⁻¹. Even with a much lower adhesion percentage (0.95%), the enzymes coming from the control treatment showed activity 0.12 mol.L⁻¹min⁻¹, showing that vegetable sponge is a good biosupport for immobilization of this yeast even without treatment.

KEYWORDS: *Saccharomyces cerevisiae*, vegetal bush, immobilization, fermentation

INTRODUÇÃO

Os microrganismos como as leveduras são capazes de produzir diversos produtos de interesse industrial, dentre os quais destaca-se a enzima invertase, obtida através da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (VARGAS *et al*, apud CHEETHAM, 1991). A invertase, também conhecida por β -frutofuranosidase (E. C. 3.2.1.26), é enzima responsável pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose – também chamados de açúcar invertido, utilizado pelas indústrias alimentícias como adoçante (NOVAKI, 2009). O açúcar invertido possui vantagens por ter um poder de adoçante 20% maior que da sacarose pura, evitar processos dispendiosos de diluição e ser de fácil armazenamento e transporte (GRATÃO *et al*, 2004).

No cenário atual da pesquisa, sabemos que microrganismos, principalmente os fungos, possuem alta plasticidade, sendo capazes de variar sua morfologia ao longo dos ciclos de vida, influenciando diretamente na obtenção de um produto de interesse industrial (COVIZZI *et al*, 2007). Uma forma de minimizar essas alterações é imobilizando o microrganismo de interesse à uma matriz sólida. Esse tipo de abordagem só pode ser feito com microrganismos que possuem metabolismo extracelular, evitando assim a necessidade de retirar o metabólito de interesse do interior da célula.. Além disso, célula imobilizada também pode ser utilizada como biocatalizadora, podendo ser explorada para pesquisa e aplicada em processos de escala industrial (COVIZZI

et al, 2007).

A utilização de matéria orgânica e renovável como bio-suporte ou matriz sólida, tendo em vista a sustentabilidade, vêm sendo atrativa para vários setores da indústria por ser econômico, de fácil obtenção e auxiliar na preservação do meio ambiente. A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) é um material abundante e acessível, dessa forma pode ser explorado como um bio-suporte adequado para a imobilização de células microbianas (COELHO, 2007).

A imobilização de um microrganismo pode trazer algumas vantagens para a indústria, dentre elas podemos considerar: o maior rendimento na produção, pois como se aumenta a concentração de células utilizadas, conseqüentemente observamos aumento na concentração de metabólitos sintetizados (COVIZZI *et al*, 2007). Além disso, esta técnica oferece facilidade de manutenção dos fermentadores, por evitar a obstrução da tubulação; dispensa algumas etapas de produção como a extração, isolamento e purificação da molécula de interesse, otimizando o processo e por fim, oferece possibilidade de reaproveitamento do microrganismo, sendo esse último, um dos principais benefícios da imobilização microbiana. (COVIZZI *et al*, 2007).

O presente estudo objetivou verificar a produção de invertase por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*). buscamos avaliar o melhor tratamento da *Luffa cylindrica* para imobilização das células, quantificar o número de células de imobilizadas após cada etapa do processo, determinar da concentração proteica após fermentação submersa e por fim, avaliar a atividade enzimática do extrato bruto contendo invertase.

METODOLOGIA

Preparo do suporte

O preparo do suporte foi realizado segundo a metodologia apresentada por Coelho (2007) com algumas modificações. A bucha vegetal utilizada como suporte foi higienizada com água e seca em estufa a 60°C antes de ser padronizada em cubos com área de 2,25 cm² e esterilizada em autoclave. Foram realizados três tratamentos e um controle. No controle, os fragmentos de *Luffa cylindrica* foram submetidos apenas a autoclavação por 15 minutos a 121°C e 1 atm, e em seguida secos na estufa a 60°C. Para os tratamentos foram utilizadas temperatura (autoclave), no qual, submeteu-se o suporte a uma temperatura de 123°C e uma pressão de 1,3 kgf/cm² por 35 minutos em um equipamento de autoclave, ou solução alcalina (NaOH) a 2%, posta em contato com a bucha e deixada sob agitação por 24 horas a 120 rpm, após o tempo de contato as buchas foram lavadas e autoclavadas de 15 minutos a 121°C e 1 atm, por fim, um misto das duas técnicas (autoclave e NaOH).

Imobilização Celular

Adicionou-se 50 mL de uma solução contendo 100 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*^[2] em erlenmeyers com as buchas devidamente tratadas. A mistura foi deixada sob agitação 120 rpm por 6 horas seguidas. As amostras foram lavadas com água destilada estéril por dez vezes.

Produção de Invertase

Depois da imobilização foram colocados 50 mL da solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 0,15 mol/L^[3] por 24 horas em estufa a 48,5 °C. O extrato obtido foi armazenado e as esponjas foram lavadas cinco vezes com água destilada estéril. Em seguida, adicionou-se mais 50 mL da mesma solução de bicarbonato de sódio para uma nova fermentação.

Quantificação de Proteínas pela Técnica de Biureto

De cada lote acima citado foi escolhido uma amostra para que fosse realizada a quantificação de proteínas. Em um tubo de ensaio foi colocado 1,0 mL da amostra e 0,5 mL de água destilada, deixou no banho termostático por 15 minutos, a 37°C, em seguida adicionou 1,5 mL do reagente de Biureto^[4] em cada tubo e leu no espectrofotômetro a 540 nm.

Medida da Atividade do Extrato Bruto Contendo Invertase

A medida da atividade da invertase contida no extrato bruto foi realizada utilizando-se uma solução de sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) a 0,5 mol/L^[5] por 10 minutos de reação. A enzima foi desnaturada por 10 minutos em um banho termostático a 95 °C. A quantidade de glicose mais frutose gerada na reação foi mensurada pela técnica de DNS^[6] segundo a metodologia SPIER (2005).

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sacarose (0,5 M) (mL)	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,375	0,5	0,75	1,0
Tampão acetato (0,05 M) (mL)	2,25	2,2	2,15	2,1	2,05	2,0	1,875	1,75	1,5	1,25
Enzima (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Tabela 1. Volume de sacarose, tampão acetato e enzima.

Alimentação

Após a primeira fermentação as esponjas foram lavadas e distribuiu-se 100 mL de solução de sacarose^[8] em cada erlenmeyer e após duas horas e meia as esponjas

foram lavadas e colocadas para a segunda fermentação.

Quantificação de Microrganismos Aderidos no Suporte

Foram realizadas cinco quantificações, sendo elas: nas Solução de *Saccharomyces cerevisiae*, após a imobilização, depois da fermentação, após a alimentação e no fim a última fermentação. Para tanto, foi separado para análise de determinação da biomassa celular uma bucha de cada lote. O suporte com a levedura aderida foi retirado do erlenmeyer e colocado em tubos falcon devidamente identificados, com 20 mL de solução tween 80 (0,01%)^[7] e posto sob agitação intensa em vórtex por 10 minutos. Em um eppendorf foi adicionado 1000 μ L a solução mais 1000 μ L de azul de metileno.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pré-tratamento realizado a base de calor tem como objetivo remover parcialmente a hidrólise de hemicelulose de forma que aumente os poros do material lignocelulósico (COELHO, 2007). O tratamento do suporte é muito importante para que a adsorção da célula no suporte seja ampliada, aumentando assim a concentração de células imobilizadas. A aplicação de substâncias alcalinas, como o hidróxido de sódio (NaOH) 2% (p/v) removem parte da hemicelulose e da lignina da superfície da bucha, causando uma modificação da estrutura cristalina da celulose, levando ao inchamento das fibras, promovendo o aumento da adesão de células (COELHO, 2007).

Para validar a eficácia dos diferentes tipos de tratamentos aplicados neste estudo, foi realizado a Técnica de Biureto após fermentação para confirmar a presença de proteínas nas amostras. O biureto passou pelas devidas etapas de padronização para ser utilizado, após isso foi plotado um gráfico com uma curva padrão do biureto, obtendo-se um R^2 próximo de 0,994 atestando assim a confiabilidade dos resultados obtidos na Tabela 2 para concentração de proteínas em cada lote.

Replicatas	Controle (mol/L. min)	NaOH (mol/L. min)	Autoclave (mol/L. min)	Misto (mol/L. min)
1	0,135	0,206	0,225	0,180
2	0,199	0,212	0,110	0,301
3	0,250	0,199	0,123	0,269
4	0,257	0,333	0,123	0,250
5	0,161	0,333	0,078	0,218
6	0,167	0,384	0,116	0,161
7	0,084	0,238	0,123	0,238
8	0,097	0,199	0,110	0,193
9	0,110	0,193	0,123	0,250
Média	0,162 \pm 0,063 ^{ac}	0,255 \pm 0,074 ^b	0,126 \pm 0,040 ^a	0,229 \pm 0,045 ^{bc}

Tabela 2. Concentração de proteína para cada tratamento, considerando a técnica de biureto.

a, b, c – Amostras com letras iguais não diferem entre si a um nível de 5 % de significância ($P < 0,05$).

Nos resultados obtidos, a amostra tratada a partir de vapor pela autoclave apresentou resultados iguais ao controle, sendo este considerado um tratamento inadequado. Desta forma, há evidências que a alta temperatura deste tratamento não tenha interferido na formação de poros da bucha impedindo assim que a levedura se aderisse ao suporte de maneira adequada. Além disto, a temperatura elevada por um longo período de tempo pode influenciar a bucha a liberar compostos indesejáveis, compostos estes que pode inibir a atividade da levedura e impedindo que a mesma produza proteínas de maneira eficiente (COELHO, 2007).

Como esperado, o lote tratado com NaOH exibiu resultados satisfatórios visto que a substância modifica a estrutura da bucha vegetal causando o inchamento das fibras e abertura de poros permitindo que a levedura se aderisse com maior facilidade. O lote misto, tratado na autoclave e NaOH apresentou resultados semelhantes aos obtidos pelas amostras tratadas apenas com NaOH. Pode-se deduzir que o tratamento de forma mista não foi eficiente, portanto a utilização da autoclave como parte da forma de tratamento se mostrou dispensável.

Atividade enzimática

A atividade enzimática foi medida através da técnica de DNS. Essa técnica também passou por padronização e obtenção de uma curva padrão atestando a confiabilidade dos dados obtidos (PETKOWICZ, 2007). A presença de proteína foi detectada pelo teste de biureto apenas após a primeira fermentação, portanto, a concentração da enzima invertase foi mensurada apenas após a primeira fermentação,. A média dos resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.

Autoclave (mol/L.min)	Controle (mol/L.min)	NaOH (mol/L.min)	Misto (mol/L.min)
0,00225	0,00518	0,00277	0,00222
0,00246	0,00342	0,00259	0,00311
0,00293	0,00447	0,00256	0,00339
0,00536	0,00518	0,00290	0,00348
0,00444	0,00407	0,00333	0,00509
0,00543	0,00530	0,00524	0,00532
0,00552	0,00506	0,00333	0,00552
0,00987	0,00601	0,00481	0,00746
0,00972	0,00721	0,00703	0,0102

Tabela 3. Média da velocidade enzimática (mol/L.min⁻¹) para cada lote.

A partir das absorbâncias obtidas determinamos o comportamento enzimático plotando gráficos da concentração celular pela velocidade da reação, utilizando o modelo de análise de Michaelis-Menten. Os gráficos abaixo são portanto complementares a Tabela 3.

O tanto no lote controle (Gráfico 1a) quanto no lote de tratamento com solução alcalina (Gráfico 1b) não foi possível evidenciar características essenciais na atividade enzimática como a constância de uma velocidade máxima, portanto é possível que a concentração proteica encontrada não seja de origem enzimática. Como o suporte do lote controle não passou por nenhum tipo de tratamento, era de se esperar que não houvesse grande aderência das células fúngicas ao suporte e por consequência a produção enzimática fosse baixa ou quase nula, como é o caso. Porém como no caso do tratamento com NaOH observou-se que este era um dos melhores tratamentos para aderência de células. Podemos deduzir que as proteínas que lá estão podem não ser de origem enzimática ou que são de origem enzimática, mas se encontram em estado desnaturado, sugerindo que tenha ficado resíduo da solução alcalina e que a técnica necessita de aprimoramento.

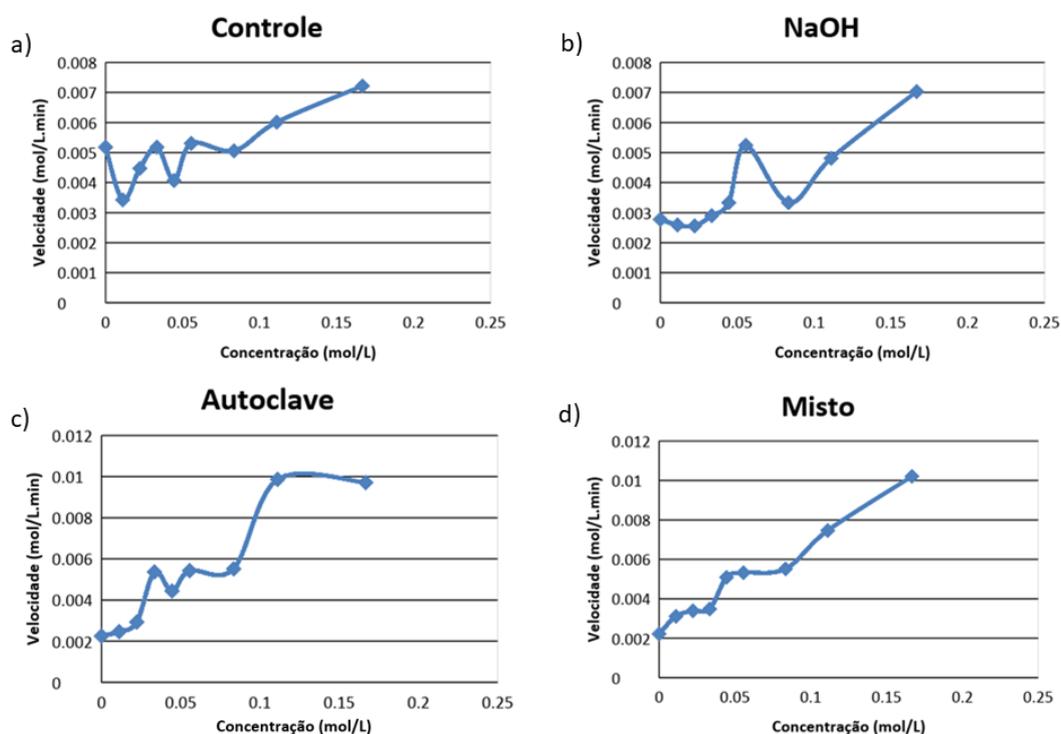


Gráfico 1. Atividade enzimática do: a) lote sem tratamento (controle). b) lote tratado com NaOH 2% (solução alcalina). c) lote sem autoclave (alta temperatura por tempo prolongado). d) lote sem autoclave (alta temperatura por tempo prolongado e solução alcalina).

O tratamento com calor prolongado (Gráfico 1c) observa-se semelhanças ao gráfico de Michaelis-Menten, já que apresenta um aumento gradual da atividade enzimática seguido de uma estabilização, caracterizando a Velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Apesar de na técnica do biureto os resultados foram insatisfatórios, comprovou-se com a técnica de DNS que o pouco de proteína que tinha era uma enzima ativa. Contudo quando a técnica de calor foi acrescida de solução básica (Gráfico 1d) percebemos novamente uma falta de singularidade com gráfico tipo de velocidade de reação. Existe um aumento gradual da velocidade pela concentração, porém não se

atinge uma velocidade máxima assim como quando se tratado o suporte apenas com hidróxido de sódio. Logo podemos entender que houve resquício de NaOH no suporte gerando uma alteração do pH da solução, acarretando na inativação das enzimas gradativamente.

Aprimoramento da técnica utilizando a solução alcalina

Considerando os resultados obtidos percebemos que o tratamento que obteve maior produção proteica foi utilizando solução básica, contudo o mesmo tratamento não apresentou atividade enzimática. A partir dessa informação optou-se por repetir esse lote com algumas alterações a fim de potencializar os resultados, desta forma, acrescentamos as seguintes etapas: alimentação das leveduras entre as fermentações e contagem do número de células aderidas à esponja em várias etapas do processo.

Após a primeira e a segunda fermentação foram mensuradas a quantidade de proteína do no meio pela técnica de biureto. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Replicatas	1ª fermentação		2ª fermentação	
	NaOH	Controle	NaOH	Controle
1	0,218	0,231	0,129	0,123
2	0,142	0,199	0,148	0,091
3	0,244	0,174	0,123	0,148
4	0,199	0,225	0,104	0,129
5	0,244	0,206	0,180	0,129
6	0,174	0,148	0,135	0,084
Média	0,205±0,040^a	0,197±0,031^a	0,137±0,026^a	0,117±0,025^a

Tabela 4. Quantificação proteica com biureto após a primeira e segunda fermentação.

^a – Amostras com letras iguais não diferem entre si a um nível de 5 % de significância ($P < 0,05$)

Nota-se que tanto no controle quanto no suporte tratado os resultados não se diferenciam entre si a um nível de 5% de significância. Behera, Mohanty e Ray (2011) realizaram a produção de etanol com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em bucha vegetal e, para isto, não tratou previamente o suporte, e mesmo obteve-se resultados positivos. Marques, Buzato e Celligoi (2006) produziram invertase com *Saccharomyces cerevisiae* e mesmo sem tratamento algum no suporte (*Luffa cylindrica*) conseguiram bons resultados. Desta forma, o resultado obtido no presente trabalho não se mostra diferente de respostas encontradas por outros autores.

Contagem celular

A concentração obtida por contagem em câmara de Neubauer apresentou para solução de NaOH uma quantidade de 1.7×10^6 UFC/mL. O controle exibiu uma contagem de 2.5×10^6 UFC/mL. Baseado nestes resultados foi descoberto a quantidade

de células aderidas em cada lote, expressos no Gráfico 2.

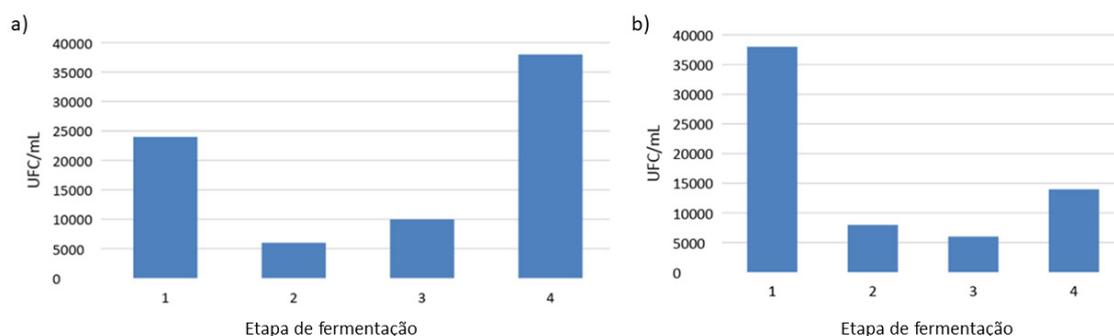


Gráfico 2. a) Concentração *Saccharomyces cerevisiae* por UFC/mL no lote controle. b) Concentração *Saccharomyces cerevisiae* por UFC/mL no lote NaOH nas seguintes etapas: (1) número de células aderidas ao suporte (UFC/mL) após da imobilização; (2) Número de células aderidas ao suporte após a primeira fermentação; (3) Número de células aderidas ao suporte depois da alimentação; (4) Número de células aderidas ao suporte após a última fermentação.

Ao se comparar o Gráfico 2a (controle) com o Gráfico 2b (tratado) percebemos que o número de células aderidas à bucha tratada com NaOH foi consideravelmente maior que a quantidade de células aderidas ao Controle, sendo de 38.000 UFC/mL ou 2,15 % de células da solução de *Saccharomyces cerevisiae* e 24.000 UFC/mL ou 0,95 %, respectivamente. Dessa forma, podemos considerar que o tratamento com hidróxido de sódio conseguiu abrir as fibras do suporte e permitir que a células se aderisse.

Nas etapas 2 e 3 observa-se um decaimento na quantidade de células. O tempo de fermentação, de 20 horas, pode ter sido o causador da morte celular, visto que o micro-organismo produzia e não era alimentado. Após a última fermentação, com o lote alimentado, a quantidade de células no lote NaOH foi inferior ao Controle. Este fato pode ser em decorrência de que o NaOH, por ser uma base forte, tenha interferido no metabolismo da levedura impedindo sua multiplicação. Além disto, o tratamento com base forte pode ter liberado substâncias nocivas provenientes do próprio suporte. Desta forma o controle exibiu melhores resultados, já que o número de células após a última fermentação foi maior, podendo assim ser mais eficiente se utilizada para uma nova fermentação e produzir uma maior quantidade do produto desejado.

Atividade enzimática

A atividade enzimática foi mensurada após a primeira e a segunda fermentação. Na primeira fermentação, como podemos observar no gráfico 3, tanto o lote controle quanto o lote de tratamento com NaOH apresentaram atividade enzimática similares, sendo que a maior velocidade de catálise obtida em ambos os tratamentos se encontram em torno de 0,005 mol/L.min. Demonstrando assim que o lote Controle foi tão efetivo quanto NaOH.

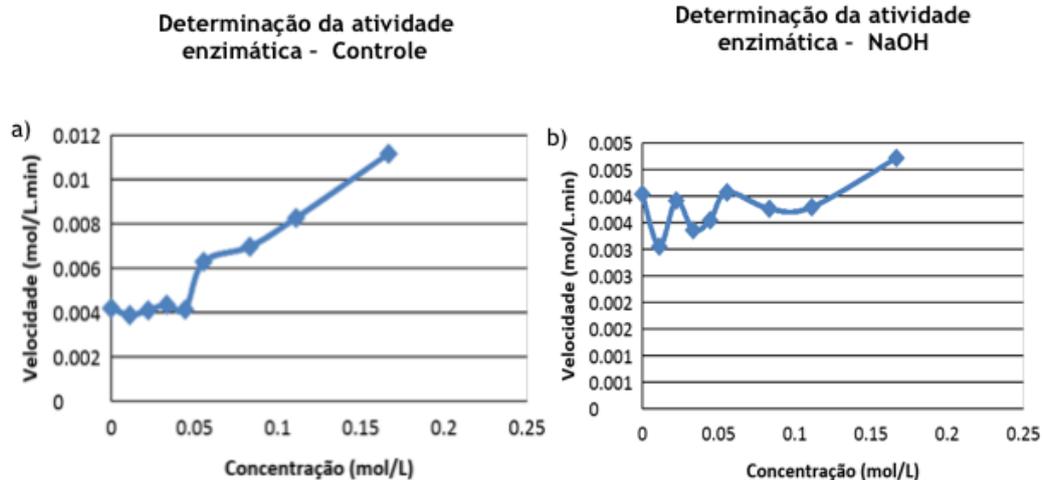


Gráfico 3. Atividade enzimática após a primeira fermentação. (a) Controle; (b) tratamento com NaOH.

Após a alimentação, pode-se notar, no gráfico 4, que a maior velocidade obtida com a enzima proveniente do lote controle foi o dobro da maior velocidade obtida com a enzima do tratamento com NaOH. Levando em consideração o teor de proteína obtido pelo método de biureto, que demonstrou a equivalência de ambos os métodos de imobilização na quantidade de proteína final, podemos concluir que é possível que as proteínas obtidas no tratamento com NaOH não sejam de origem enzimática ou estejam inativas. Desta forma, as células imobilizadas no controle produziram as proteínas enzimáticas de interesse deste trabalho.

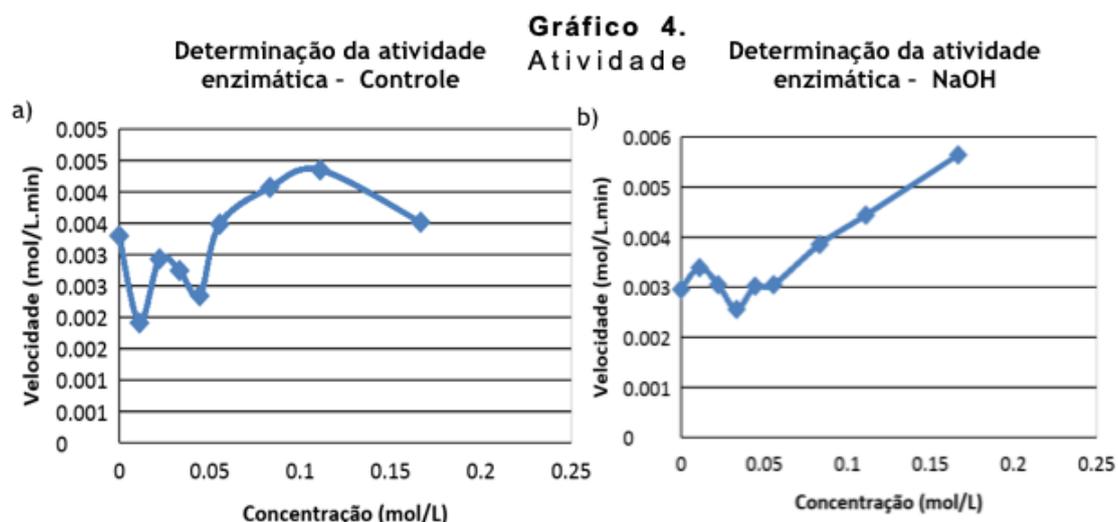


Gráfico 4. Atividade enzimática após a primeira fermentação. (a) Controle; (b) tratamento com NaOH.

CONCLUSÃO

Após a realização de três tipos de tratamentos diferentes em bucha vegetal constatou-se que o lote tratado com NaOH ofereceu melhores condições para que

as células se aderissem ao suporte. Contudo, mesmo apresentando quantidade de células aderidas mais elevado se comparado aos demais tratamentos, foi o controle, um lote com número inferior de células imobilizadas que obteve melhor resultado na produção de proteínas com atividade catalítica na hidrólise de sacarose. O resultado apresentado por ambos os lotes se mostraram similares, portanto consideramos que o melhor tratamento para imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em bucha vegetal foi o controle. Este fato é animador uma vez que a aplicação do lote não tratado propiciará a redução de gastos com preparo do suporte.

Os resultados apresentados pelo presente trabalho demonstraram que foi possível a obtenção de invertase através de leveduras imobilizadas em escala laboratorial, contudo, a quantidade produzida não é aceitável para aplicação do processo em alta escala, sendo necessário a otimização das etapas de fermentação em trabalhos futuros para aplicação da técnica em processos industriais

REFERENCIAS

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Capítulo 1 – Introdução. **TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**. 1ed. Rio de Janeiro: Epub, 284f, p. 8 – 9.

COELHO, T. C.; **AValiação de condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol**. 2007. 90p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2007.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R.; **IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**. 2007. 143-160p – Ciência Exatas e Tecnológicas, Londrina – Paraná.

GRATÃO, A. C. A.; BERTO, M. I.; JÚNIOR, V. S. **REOLOGIA DO AÇÚCAR LÍQUIDO INVERTIDO: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA VISCOSIDADE**. 2004, 5f. Campinas – São Paulo.

HASAN, S. D. M.; NOVAKI, L.; KADOWAKI, M. K.; ANDRADE, D. **PRODUÇÃO DE INVERTASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE FARELO DE SOJA**. 2010. 9f. Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Toledo – Paraná.

MAGNANI, M.; HERNAN, R. J. B-GLUCANA DE *Saccharomyces cerevisiae*: **CONSTITUIÇÃO, BIOATIVIDADE E OBTENÇÃO**. 2008. 20f. Doutorado em Ciências de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina – UEL. Londrina – Paraná.

MEDRADO, L. C.L.; **ADSORÇÃO DE ÍONS CROMO (VI) PROVENIENTE DE EFLUENTES DE CURTUMES EM BUCHA VEGETAL (*LUFFA CYLINDRICA*) MODIFICADA COM ÁCIDO CÍTRICO**. 2011. 36p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel, Química Industrial) – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **LEHNINGER PRINCÍPIOS DA BIOQUÍMICA**. 4ed. Sarvier, 2006, 1202f.

NOVAKI, L. **PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA INVERTASE OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE SOJA COM *Aspergillus casingii***. 2009, 70f. Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Toledo – Paraná.

OGBONNA, J. C.; LIU, Y. C.; LIU, Y. K.; TANAKA, H. Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as a Carrier for microbial cell immobilization. **JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING**, v.78, p. 434-442, 1994.

PASTORE, G. M; BICAS, J. B; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. **BIOTECNOLOGIA DE ALIMENTOS**. 1ed. São Paulo: Atheneu, 2013, 520f, v. 12.

SANTOS, A. M.; **FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM LEVEDURA IMOBILIZADA EM COLMOS DE BAMBU E EM FIBRA DE COCO**. 2008. 82p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Maceió – Alagoas.

VARGAS, L. H. M.; CAMPOS, V. E.; CELLIGOI, M. A. P. C. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SONICAÇÃO NA LIBERAÇÃO DE INVERTASE POR *Saccharomyces cerevisiae*. 7f. Universidade Estadual de Londrina – UEL. Londrina – Paraná.

VERBELEN, P.J., DE SCHUTTER, D.P., DELVAUX, F., et al., 2006, **IMMOBILIZED YEAST CELL SYSTEMS FOR CONTINUOUS FERMENTATION APPLICATIONS**; Springer Science+Business Media B.V.

VIANA, T. M. L. **CARACTERIZAÇÃO BIOENERGÉTICA DE *Saccharomyces cerevisiae* EM FERMENTAÇÃO VINÁRIA**. 2009. 125f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

VICHIATO, M. R. M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D. M.; DUTRA, L. F.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, T. S.; **BUCHA VEGETAL E FERTILIZAÇÃO ORGANO-MINERAL NO CULTIVO DE *Dendrobium nobile* lindl.** 2008, Uruguaiana, v. 15, n.1, p. 34-42.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-359-0

