



**BIANCA NATÁLIA ALVES**

**AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE MOINHO DE BOLAS E  
CHOQUE OSMÓTICO PARA RUPTURA CELULAR DA  
*Sacharomyces cerevisiae*.**

**LAVRAS – MG**

**2020**

**BIANCA NATÁLIA ALVES**

**AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE MOINHO DE BOLAS E CHOQUE OSMÓTICO PARA  
RUPTURA CELULAR DA *Sacharomyces cerevisiae*.**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia Química, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Alves, Bianca Natália.

Avaliação dos métodos de Moinho de bolas e Choque osmótico  
para ruptura celular da *Sacharomyces cerevisiae*. / Bianca Natália

Alves. - 2020.

55 p. : il.

Orientador(a): Lucino Jacob Corrêa.

TCC (graduação) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Extração enzimática. 2. Métodos de rompimento celular. 3.  
Enzima invertase. I. Corrêa, Lucino Jacob. II. Título.

**BIANCA NATÁLIA ALVES**

**AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE MOINHO DE BOLAS E CHOQUE OSMÓTICO  
PARA RUPTURA CELULAR DA *Sacharomyces cerevisiae*.**

**EVALUATION OF BALL MILL AND OSMOTIC SHOCK METHODS FOR CELL  
RUPTURE OF *Sacharomyces cerevisiae*.**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia Química, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 21/ 08/ 2020.

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa– UFLA

Prof. João Moreira Neto – UFLA

Prof. Gilson Campani Júnior - UFLA

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2020**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Bento e Maria Aparecida, que acreditaram e não mediram esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus avós, Antônia e João, minha maior inspiração e fonte de afeto.

Ao meu orientador, Luciano Jacob Côrrea, por confiar em mim e oferecer todos os seus ensinamentos com didática e paciência ímpares.

A Matheus Felipe, meu primeiro amigo na Engenharia Química e melhor companheiro de estudos. Sem o seu apoio e cumplicidade, jamais teria conseguido chegar até aqui.

As minhas amigas Laísa, Letícia, Polyanna e Thaynara. Por me fazerem sentir mais capaz do que sou e me tornarem mais forte do que sonhei.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

Algumas biomoléculas são acumuladas intracelularmente em células de microrganismos. O processo de ruptura celular constitui o fator chave na produção e purificação de enzimas intracelulares. Neste estudo, foi realizado o rompimento da parede celular da *Sacharomyces cerevisiae* (fermento biológico) através dos Métodos do Moinho de Bolas e Choque Osmótico para extração da enzima invertase. Para ambos os métodos foram variados os tempos de extração (1; 5 e 10 min). Além disso para o Método do Moinho de Bolas foi variada a quantidade de esferas (1; 3 e 5 g) e para o Método do Choque Osmótico a concentração de bicarbonato (0,1; 0,5 e 1 M). Para a obtenção do extrato enzimático, ao final do rompimento foi realizada a purificação do produto através de Centrifugação. Posteriormente foi promovida uma reação entre o extrato enzimático e uma solução de sacarose, e feita a leitura espectrofotométrica da glicose formada. Através da Curva Padrão da glicose foi possível calcular a velocidade de reação e a atividade enzimática. Analisando os valores obtidos para atividade, foi percebido que em ambos os métodos, houve crescimento da mesma com o aumento do tempo. Os resultados também apontaram que para o Moinho de Bolas, a atividade cresceu com o aumento da quantidade de esferas. Nesse caso, a opção mais viável dentre as condições avaliadas, é a combinação que inclui a maior quantidade de esferas de vidro (5 g) e o menor tempo (1 minuto). Já para o Choque Osmótico, a atividade diminuiu com o aumento da concentração de bicarbonato, indicando inibição da reação. A opção mais viável foi a concentração de 0,1 M de bicarbonato combinada com o maior tempo (10 minutos) onde os resultados foram expressivamente melhores. Para análise da opção mais viável não foi levado em conta apenas os valores obtidos, mas também os esforços empreendidos para alcança-los. Em comparação aos dois métodos estudados, foi concluído que o Moinho de bolas é o mais eficiente, sendo que as atividades por ele obtidas variam entre 56 e 77 U/mL aproximadamente, enquanto que para o método do Choque Osmótico, os valores de atividade variam entre 11 e 51 U/mL aproximadamente.

**Palavras-Chave:** Levedura, Enzima, Ruptura Celular, Moinho de Bolas, Choque Osmótico, atividade enzimática.

## ABSTRACT

Some biomolecules are accumulated intracellularly in cells of microorganisms. The cell disruption process is the key factor in the production and purification of intracellular enzymes. In this study, the rupture of the cell wall of *Sacharomyces cerevisiae* (biological yeast) was carried out through the Ball Milling and Osmotic Shock Methods for the extraction of the invertase enzyme. For both methods, the extraction times were varied (1; 5 and 10 minutes). Moreover, for the Ball Milling Method the quantity of spheres was varied (1; 3 and 5 g), and for the Osmotic Shock Method the concentration of bicarbonate (0.1; 0.5 and 1 M). By the end of the disruption, to obtain the enzymatic extract, the product was purified by centrifugation. Subsequently, a reaction between the enzyme extract and a sucrose solution was carried out, and the spectrophotometric reading of the formed glucose was made. With the Standard Glucose Curve, it was possible to calculate the reaction rate and the enzyme activity. Analyzing the values obtained for the activity, it was noticed that in both methods, there was an increase in activity as time went by. The results also showed that for the Ball Milling, the activity grew with the increase in the quantity of spheres. In this case, the most viable option among the conditions evaluated, is the combination that includes the largest amount of glass spheres (5 g) and the shortest time (1 minute). As for the Osmotic Shock, the activity decreased with the increase of the bicarbonate concentration, indicating inhibition of the reaction. The most viable option was the 0.1 M concentration of bicarbonate combined with the longest time (10 minutes), where the results were significantly better. For the analysis of the most viable option, not only the values obtained were taken into account, but also the efforts made to achieve it. Comparing the two methods studied, it was concluded that the Ball Milling is the most efficient, since the activities obtained by it vary between 56 and 77 U/mL approximately, whereas for the Osmotic Shock Method, the activity values vary between 11 and 51 U/mL approximately.

**Keywords:** Yeast, Enzyme, Cell Disruption, Ball Milling, Osmotic Shock, enzyme activity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vista em microscopia eletrônica.....	4
Figura 2 - Representação esquemática do efeito do catalisador na energia de ativação. ....	7
Figura 3 - Esquema de catálise enzimática.....	10
Figura 4 - Molécula de Frutose.....	12
Figura 5 - Moléculas de $\alpha$ e $\beta$ -glicose. ....	13
Figura 6 - Molécula de Sacarose. ....	13
Figura 7 - Estrutura tridimensional da enzima invertase.....	15
Figura 8 – Moinho de Bolas. ....	19
Figura 9 -Tubo no agitador Vórtex.....	21
Figura 10 - Curva Padrão da Glicose. ....	25
Figura 11 - Dados da Atividade Enzimática pelo Tempo para o Moinho de Bolas.....	29
Figura 12 - Dados da Atividade Enzimática pelo Tempo para o Choque Osmótico .....	31
Figura 13- Dados da Inversão de Sacarose pelo Tempo para o Moinho de Bolas.....	35
Figura 14 - Dados da Inversão de Sacarose pelo Tempo para o Choque Osmótico .....	36
Figura 15 - Gráfico Atividade Enzimática pelo Tempo. Comparação entre os Métodos do Moinho de Bolas e Choque Osmótico.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Combinações de Tempo e Quantidade de Esferas das amostras avaliadas.....	22
Tabela 2 - Combinações de Tempo e Concentração de Bicarbonato das amostras avaliadas..	23
Tabela 3 - Valores da Concentração de Glicose para o Método do Moinho de Bolas.....	25
Tabela 4 - Valores da Concentração de Glicose para o Método do Choque Osmótico .....	27
Tabela 5 - Valores da Atividade Enzimática para o Método do Moinho de Bolas .....	28
Tabela 6 - Valores da Atividade para o Método do Choque Osmótico.....	31
Tabela 7 - Inversão da Sacarose em glicose para o Método Moinho de Bolas .....	35
Tabela 8 - Inversão da Sacarose em glicose para o Método do Choque Osmótico.....	36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Geral .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Específicos .....</b>	<b>2</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Leveduras .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1.1 <i>Sacharomyces Cerevisiae</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>3.2 Velocidade de Reação.....</b>	<b>6</b>
<b>3.3 Enzimas .....</b>	<b>8</b>
<b>3.3.1 Catálise Enzimática .....</b>	<b>9</b>
<b>3.3.2 Medição da Dosagem de uma Enzima .....</b>	<b>10</b>
<b>3.3.3 Inibidores Enzimáticos.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4 Açúcares: Sacarose, Glicose e Frutose.....</b>	<b>12</b>
<b>3.5 O Processo de Inversão da Sacarose .....</b>	<b>13</b>
<b>3.5.1 A Enzima Invertase .....</b>	<b>15</b>
<b>3.6 Métodos de Rompimento .....</b>	<b>16</b>
<b>3.6.1 Rompimento por Moinho de Bolas .....</b>	<b>18</b>
<b>3.6.2 Rompimento por Choque Osmótico .....</b>	<b>20</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Determinação da Curva Padrão para a Glicose .....</b>	<b>20</b>
<b>4.2 Método do Moinho de Bolas .....</b>	<b>21</b>
<b>4.3 Método do Choque Osmótico .....</b>	<b>22</b>

<b>4.4</b>	<b>Quantificação de Glicose.....</b>	<b>23</b>
<b>4.5</b>	<b>Procedimento de Diluição .....</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DICUSSÕES.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Curva Padrão para a Glicose .....</b>	<b>25</b>
<b>5.2</b>	<b>Concentração de Glicose .....</b>	<b>26</b>
<b>5.3</b>	<b>Atividade Enzimática .....</b>	<b>27</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Atividade Enzimática nos Diferentes tempos de Extração e Quantidade de Esferas .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Atividade Enzimática nos Diferentes Tempos de Extração e Concentração de Bicarbonato.....</b>	<b>30</b>
<b>5.4</b>	<b>Inversão da Sacarose .....</b>	<b>33</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Inversão da Sacarose em Glicose para os Diferentes tempos de Extração e Quantidade de Esferas .....</b>	<b>34</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Inversão da Sacarose em Glicose para os Diferentes tempos de Extração e Concentração de Bicarbonato .....</b>	<b>36</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação de Viabilidade .....</b>	<b>37</b>
<b>5.6</b>	<b>Comparação entre os Métodos: Choque Osmótico e Moinho de Bolas.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos pertencentes ao Reino Fungi, as quais se apresentam predominantemente sob a forma unicelular, diferenciando-se dos fungos verdadeiros (ou mofos) que são organismos geralmente multicelulares (SANTIN, 1996). Exercendo papel similar ao das bactérias, as leveduras são típicas consumidoras de matéria orgânica (SANTIN, 1996, p.6).

É possível destacar, o surgimento de uma forte tendência em explorar comercialmente leveduras, através do isolamento de alguns de seus principais constituintes como enzimas, nucleotídeos, proteínas, polissacarídeos, além de lipídios (BELEM e LEE, 1998; CAMERON et al., 1998 apud SILVA, 2007, p.2).

A *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se como a espécie mais explorada comercial e industrialmente entre as leveduras, encontrando aplicação por exemplo na indústria cervejeira e de panificação. Dessa espécie é extraída a enzima invertase. O uso da invertase está principalmente relacionado à indústria alimentícia, na fabricação do xarope de glicose e frutose, também chamado açúcar invertido (SAID & PIETRO, 2004 apud NOVAKI, 2010).

Alguns produtos de nosso interesse cotidiano, tais como enzimas, se encontram aprisionados intracelularmente nos microrganismos. Para se ter acesso a tais produtos, é realizado um dos mais importantes processos de *downstream*: a ruptura celular.

Os métodos de rompimento celular podem ser classificados como:

- a) Mecânicos: Rompimento através da abrasão da parede celular por forças cisalhantes
- b) Não mecânicos: Também denominados métodos físicos, o rompimento da parede se dá através de mudanças físicas impostas a célula, como por exemplo aquecimento e congelamento.
- c) Químicos: O rompimento é proporcionado pela interação química entre a parede celular e solventes específicos.
- d) Enzimáticos: Lise da parede celular ocasionada por enzimas.

Este trabalho, foi desenvolvido a partir da adaptação de um experimento realizado na disciplina GNE 437- Separação e Purificação de Bioprodutos do curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Lavras. Foram investigados um método de rompimento mecânico (Moinho de Bolas) e um não-mecânico (Choque Osmótico) para extração da enzima invertase a partir da levedura *Saccharomyces Cerevisiae*.

No Método do Moinho de Bolas, utilizam-se pérolas de vidro em um recipiente contendo a suspensão celular. O rompimento celular ocorre a partir do choque de esferas com a biomassa, o que promove transferência de energia e consequente rompimento das células (TAMER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1998 apud QUINES et al., 2015, n.p). Já para o Método do Choque Osmótico, o mecanismo de rompimento é baseado no fato de que a pressão osmótica interna rompe a membrana, ou parte dela, permitindo que o conteúdo intracelular seja liberado para o meio externo (MACHADO JÚNIOR, 2014, p.18).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Este trabalho teve como objetivo principal realizar e investigar a extração da enzima invertase através de rompimento celular da *Sacharomyces Cerevisiae* (fermento biológico) pelos métodos do Moinho de Bolas e Choque Osmótico.

### **2.2 Específicos**

Por conseguinte, os objetivos específicos desdobram-se em:

- a) Avaliar através de medidas da atividade da enzima invertase a eficiência dos métodos de rompimento celular da *Sacharomyces cerevisiae* aplicados.
- b) Calcular e analisar a porcentagem de inversão da Sacarose em Glicose para cada um dos métodos de rompimento celular da *Sacharomyces cerevisiae* aplicados.
- c) Avaliar o impacto na eficiência de ruptura pelo método de Moinho de Bolas, de acordo com a variação no tempo de ruptura (1, 5 e 10 min) e quantidade de esferas utilizadas (1, 3 e 5g).
- d) Avaliar o impacto na eficiência de ruptura pelo método de Choque Osmótico, de acordo com a variação no tempo de ruptura (1, 5 e 10 min) e concentração de solução de Bicarbonato de sódio utilizada (0,1; 0,5 e 1M).
- e) Realizar um comparativo entre os dois métodos e verificar os prós e contras de cada um, afim de identificar a melhor opção.
- f) Aplicar os conhecimentos adquiridos nas disciplinas GNE-342 Engenharia Bioquímica e GNE 437-Separação e Purificação de Bioprodutos.

## 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 3.1 Leveduras

As leveduras são microrganismos predominantemente unicelulares pertencentes ao Reino Fungi. Elas se diferenciam dos fungos verdadeiros (ou mofos) por serem estes, multicelulares (SANTIN, 1996). Tais microrganismos, são de inestimável importância para o processo científico, constituindo o modelo celular que possibilitou a elucidação dos processos bioquímicos e metabólicos fundamentais das células vivas eucarióticas (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006).

Exercendo papel similar ao das bactérias, as leveduras são típicas consumidoras de matéria orgânica. Porém, são facilmente diferenciadas das bactérias em virtude de suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas (SANTIN, 1996, p.6).

Sobre a forma e composição das leveduras, Santin (1996, p.6) ainda destaca:

[...] sua forma é bastante variável, indo desde elementos esféricos até células elípticas bastante alongadas, quase filamentosas. Suas células apresentam as características dos seres eucarióticos, possuindo uma estrutura celular altamente organizada. Membrana citoplasmática lipoprotéica, cuja principal função é regular as trocas com o meio ambiente. Possuem, também, uma parede celular rígida, constituída principalmente de dois polissacarídeos: manana e glucana; além disso, contêm proteínas e lipídios. No citoplasma, encontram-se, além dos componentes usuais em solução, um ou mais vacúolos, delimitados por uma membrana (SANTIN, 1996, p.6).

Constituindo cerca de 15 a 25% da massa seca da célula, a parede celular de leveduras possui muitas e importantes funções, entre elas: proteção física, estabilidade osmótica, suporte de enzimas, adesão célula/ célula e barreira de permeabilidade seletiva. Além disso, caracteriza-se como uma estrutura dinâmica, realizando o transporte de nutrientes para o citoplasma, proporcionando a integridade, o metabolismo e o crescimento celular (CABIB, 1997 apud FLEURI; SATO, 2005).

As leveduras contam com 50 a 70% de proteína bruta em base seca, sendo que aproximadamente 20% desta contém nitrogênio não proteico, representado basicamente por ácidos nucleicos que apresentam de 8 a 12% do nitrogênio (BRESSANI, 1968 e REED & PEPPLER, 1973 apud JÚNIOR; ARÉVALO, 2001, p.54).

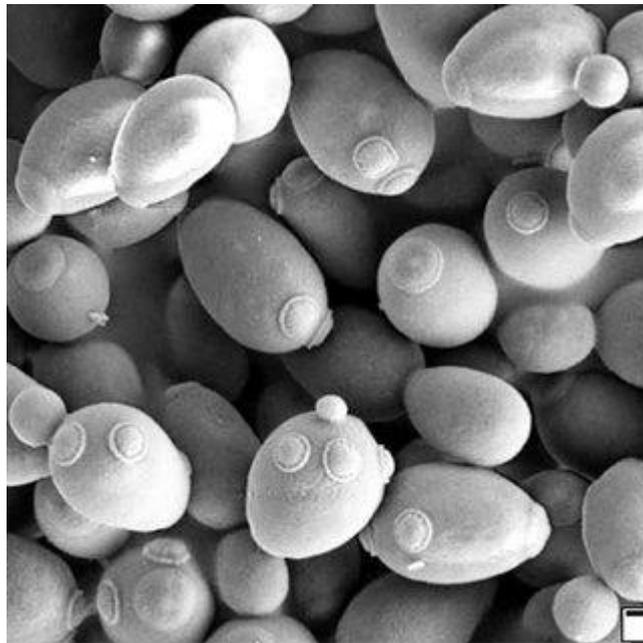
É possível destacar o surgimento de uma forte tendência em explorar comercialmente leveduras, através do isolamento de alguns de seus principais constituintes como enzimas (invertase, lactase), nucleotídeos, proteínas (nanoproteínas), polissacarídeos (glucanas,

mananas), além de lipídios, como fosfolipídios e ergosterol (BELEM e LEE, 1998; CAMERON et al., 1998 apud SILVA, 2007, p.2).

### 3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

O *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular que pertence ao filo Ascomycota, classe de Hemiascomicete e ordem Saccharomicetales. Possui ampla gama de habitats como folhas, flores, solo e água. O significado de seu nome é “cogumelo de açúcar de cerveja”, devido sua aplicação na produção desta bebida. Caracteriza-se um microrganismo aeróbio facultativo, ou seja, ajusta-se metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (THPANORAMA, 2015, n.p). As leveduras *S. cerevisiae* são elípticas, medindo cerca de 6 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento por 5  $\mu\text{m}$  de largura. Reproduzem-se assexuadamente por brotamento, sendo a temperatura ótima de seu crescimento entre 20 e 30°C, com o pH entre 4,5 e 5,5. (COELHO, 2013, n.p).

Figura 1- *Saccharomyces cerevisiae* vista em microscopia eletrônica.



Fonte: Oliveira, 2018, p.2.

Aguilar-Uscanga; François, (2003) apontaram os componentes principais da parede celular de *S. cerevisiae* como polímeros de manose (constituindo manoproteínas), glucanas (principalmente betaglucanas, mas galactanas também podem ser encontradas) e polímeros de

N- acetilglucosamina (formando quitina). Estes componentes estão unidos por ligações covalentes (apud MONKS, 2012).

As mananas-proteínas correspondem a aproximadamente 30% do peso seco da parede celular, (LEE et al., 2001 apud FERRACINI-SANTOS et al., 2009, n.p) estão localizadas na parte externa da parede celular e são compostas por polímero de manose com ligações  $\alpha$ 1,2,  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,6 (A.,1968; KAPTEYN et al.,1999; LAMPEN; NAGASAKI, 1975; YAMAMOTO apud FLEURI;SATO, 2005, n.p). As mananas-proteínas ligam-se covalentemente a cadeias de  $\beta$ -1,6-glucana e  $\beta$ -1,3-glucana. A  $\beta$ -1,6-glucana corresponde à cerca de 5% do peso seco da parede celular. Mais da metade da parede celular (50-60%) é formada por  $\beta$ -1,3-glucana, (SUPHANTHARIKA et al.,2003 apud FERRACINI-SANTOS et al., 2009).

As  $\beta$ -1,3-glucanas apresentam habilidade para estimular o sistema imunológico (FREITAS et al., 2004; LEE et al., 2001 apud FERRACINI-SANTOS et al., 2009, n.p). Devido a esta função biológica, esse polissacarídeo pode exercer efeito benéfico contra uma série de doenças, como infecções virais, bacterianas e fúngicas, além de tumores, efeitos de radiações e supressão imune devido ao estresse (KIM et al., 2005 apud FERRACINI-SANTOS et al., 2009, n.p).

As enzimas  $\beta$ -glucanases são empregadas no preparo do mosto para fabricação de cerveja e são adicionadas às rações animais para aumentar a digestibilidade das  $\beta$ -glucanas presentes em grãos como trigo, cevada, aveia e centeio (KIRK et al., 2002; McCARTHY et al., 2005 apud ORLANDELLI et al., 2012, p.101).

Coelho (2013, n.p), destaca a importância industrial e comercial da *S. cerevisiae* e elenca os motivos de tal:

A *S. cerevisiae* destaca-se como a espécie mais explorada comercialmente entre as leveduras e apresenta grande emprego na indústria, para fabricação de vários produtos. Isso ocorre pois, em relação a outras leveduras, a *S. cerevisiae* apresenta fácil isolamento e manutenção, pouca exigência nutricional, bom crescimento em meios constituídos por resíduos industriais e, amplo uso em processos industriais (podendo ser usada na produção de bebidas alcoólicas, vitaminas, fermento de pão, cosméticos, enzimas, macromoléculas e etc (COELHO, 2013, n.p).

O primeiro processo biotecnológico para a produção industrial de microrganismos úteis ao homem foi o de levedura de panificação, *Saccharomyces cerevisiae* (FERRACINI-SANTOS et al., 2009). Na presença de oxigênio, as leveduras oxidam os açúcares a dióxido de carbono que são responsáveis pelas “bolhas de ar” no pão (Pelcsar Jr. et al., 2004 apud CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006, p.37). Por possuir qualidades nutritivas, a *S. cerevisiae* passou também

a ser produzida para utilização como alimento humano ou animal (FERRACINI-SANTOS et al., 2009, n.p). Cepas desta espécie são utilizadas no processo de fermentação para a produção de bebidas alcoólicas. Por milhares de anos as leveduras de cervejaria e padaria têm sido utilizadas. Tal fato, demonstra que a importância econômica da *S. cerevisiae* é de longa data (Pelcsar Jr. et al., 2004 apud CARVALHO; BENTO; SILVA,2006).

### 3.2 Velocidade de Reação

Tomando como exemplo a conversão irreversível de uma substância A em B, através de uma reação elementar:



A velocidade da reação ( $v$ ) será:

$$v = \frac{d[B]}{dt} \quad \text{ou} \quad v = -\frac{d[A]}{dt} \quad (2) \text{ e } (3)$$

Onde  $[B]$  e  $[A]$  representam as concentrações molares de “B” e de “A”. A unidade de  $v$  é dada em mols por litro por segundo. Através da Equação (3), percebe-se que a medida que é consumido o reagente “A”, a velocidade da reação diminui. Pode-se concluir então, que para uma reação elementar, a velocidade é proporcional a concentração de A, como demonstra a Equação (4):

$$v = k[A] \quad (4)$$

Onde a constante “ $k$ ” é chamada de constante de velocidade de reação, com unidade de  $s^{-1}$ .

A reação representada na Equação (1) é classificada como de primeira ordem, pois, como pode ser observado na Equação (4), sua velocidade depende da concentração de um reagente com expoente 1. Entretanto, segundo Marzzoco e Torres (1999) p.60, a maior parte das reações químicas processadas nos organismos são mais complexas, por envolverem pelo menos, três moléculas diferentes e por serem, geralmente reversíveis. São reações de segunda ordem representadas por:



Se tais reações forem elementares, pode-se demonstrar, as velocidades de reação, respectivamente:

$$v = k[A]^2 \text{ e } v = k[A][B] \quad (7) \text{ e } (8)$$

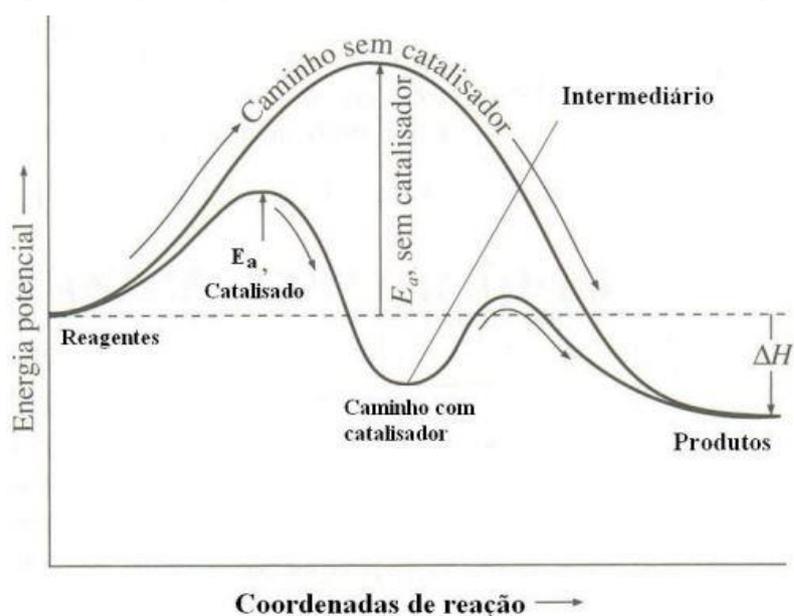
Marzzoco e Torres (1999, p.60), explica que para estes casos, a velocidade da reação pode ser explicada pela Teoria das Colisões:

Esta teoria estabelece que, para reagir, as moléculas presentes em uma solução devem colidir com orientação apropriada e que a colisão deve levá-las a adquirir uma quantidade mínima de energia que lhes permita atingir um estado reativo, chamado estado de transição. Para levar todas as moléculas de um mol de uma substância até o estado de transição necessita-se de uma quantidade de energia definida como energia de ativação. Esta energia é, portanto, a barreira que separa os reagentes dos produtos. A velocidade de uma reação será diretamente proporcional ao número de moléculas com energia igual ou maior do que a energia do estado de transição (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.60).

A velocidade de uma reação pode ser aumentada através de três maneiras diferentes, segundo Marzzoco e Torres (1999):

1. Aumentando a concentração de reagentes, como previsto pela equação da velocidade;
2. Aumentando a temperatura. Com o aumento da temperatura, um número maior de moléculas atinge a energia de ativação, e a velocidade da reação aumenta;
3. Diminuindo a barreira imposta pela energia de ativação. A redução no valor da energia de ativação pode ser obtida pela presença de catalisadores.

Figura 2 - Representação esquemática do efeito do catalisador na energia de ativação.



Fonte: Silva; Rodrigues e Nono, 2008 apud Russel, 1994, p.9.

Define-se catalisador como uma substância que aumenta a velocidade de uma reação sem ser consumida durante a mesma. Isso acontece porque o catalisador é utilizado numa etapa inicial do mecanismo da reação química, e é regenerado na etapa seguinte. A atuação do catalisador se dá, mostrando um mecanismo alternativo para a reação. Na presença de catalisador, a reação ocorre através de um novo caminho com Energia de ativação menor, como pode ser observado na Figura 2. Ainda pela Figura 2, pode-se verificar que a variação na entalpia ( $\Delta H$ ) da reação só depende da identidade dos reagentes e produtos, ou seja, independe do caminho do mecanismo (SILVA; RODRIGUES e NONO, 2008 apud RUSSEL, 1994).

Todas as células dispõem de proteínas capazes de exercer função catalítica: são as enzimas, que, na verdade, catalisam praticamente todas as reações químicas que se processam nos seres vivos. A eficiência da catálise enzimática deriva da ligação do reagente (substrato) à enzima. Os catalisadores criam um novo “caminho” para a reação, com um novo estado de transição, que requer uma energia de ativação menor (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.62)

### 3.3 Enzimas

Monteiro (2009, p.9), definiu Enzimas como:

As enzimas são moléculas orgânicas de natureza proteica especializadas na catálise de reações biológicas que aceleram a velocidade de uma reação e que são aplicadas industrialmente. Os processos catalisados por enzimas são geralmente mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis. As enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbiana (MONTEIRO, 2009, p.9).

Diante desse fato, a pesquisa de novas enzimas ou o melhoramento do desempenho de catálise de enzimas já conhecidas se faz necessário. A busca de microrganismos que possam produzir essas enzimas é constante e várias técnicas de biologia molecular estão disponíveis hoje para utilização nesse processo. Talvez a maior dificuldade da indústria seja encontrar enzimas que possam suportar algumas condições industriais extremas como variação de temperatura e pH. No Brasil, o Governo Federal instituiu a produção e o desenvolvimento de enzimas como área estratégica de desenvolvimento (MONTEIRO; SILVA, 2009).

As aplicações das enzimas no mercado industrial mundial estão ligadas à Biotecnologia, um conjunto de áreas ligadas à ciência e tecnologia que envolve Microbiologia, Genética, Bioquímica e Engenharia Química. Estão presentes em vários processos industriais como nas indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentos e de papel e celulose. Do ponto de vista industrial, uma enzima comercialmente utilizável é aquela que garante a obtenção de um produto final de melhor qualidade que o produto tradicional; a melhoria do processo de produção, reduzindo custos laboratoriais; a produção de produtos disponíveis de forma reduzida ou indisponíveis no mercado (ABRAHÃO NETO, 2001 apud ORLANDELLI et al., 2012, p.100).

### 3.3.1 Catálise Enzimática

Apesar de toda a molécula enzimática ser necessária ao processo catalítico, segundo Marzzoco e Torres (1999), a ligação com o substrato dá-se apenas em uma região pequena e bem definida da enzima. Esta região à qual o substrato se liga é chamada de centro ativo (ou sítio ativo) da enzima.

[...] O centro ativo é formado por resíduos de aminoácidos, trazidos à proximidade uns dos outros pelos dobramentos da cadeia polipeptídica que definem a estrutura terciária da proteína. O centro ativo, assim organizado, constitui uma cavidade com forma definida, que permite à enzima “reconhecer” seu substrato. Como cada enzima possui uma organização estrutural específica, o seu centro ativo permite a ligação apenas do seu substrato, trazendo grande especificidade para a catálise. O nível de especificidade varia com a enzima considerada (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.65).

A enzima em uma primeira etapa, combina-se reversivelmente com o substrato, formando um complexo enzima-substrato (ES) em uma etapa relativamente rápida. O complexo ES é a chave para entender o comportamento catalítico:



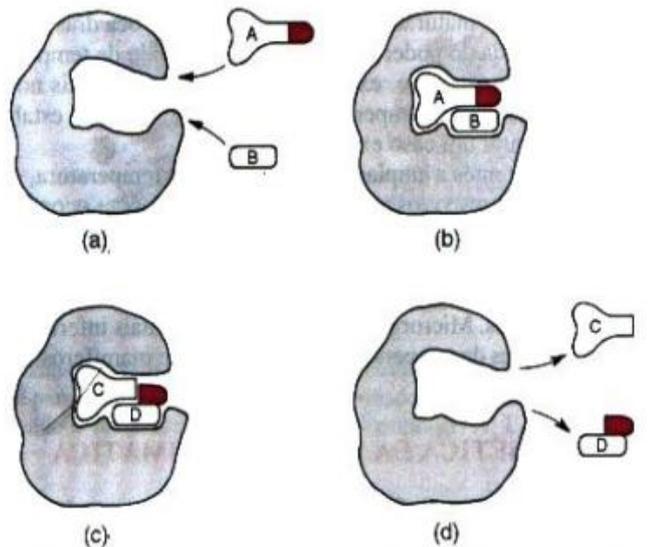
Em um determinado instante de uma reação catalisada por enzima, a enzima existe em duas formas: na forma livre ou não combinada (E) e na forma combinada como complexo (ES). Em baixas concentrações de substrato, a maior parte da enzima se encontra na forma não combinada (E). Assim, a velocidade é proporcional à concentração de substrato, pois o equilíbrio da Equação (9) é deslocado na direção da formação de ES à medida que a concentração de substrato aumenta. A velocidade inicial máxima de uma reação catalisada ( $v_{máx}$ ) ocorre quando quase toda enzima estiver presente no complexo ES e a concentração de E for desprezível (NELSON; COX, 2014).

Durante uma segunda etapa, mais lenta, o complexo ES é rompido, liberando enzima livre (E) e produto (P):



Essa segunda etapa, por ser mais lenta, limita a velocidade da reação total. A velocidade total deve ser então, proporcional à concentração das espécies que reagem na segunda etapa, isto é, ao complexo ES. Após o rompimento do complexo ES, a enzima fica livre para catalisar a reação de mais uma molécula do substrato (NELSON; COX, 2014).

Figura 3 - Esquema de catálise enzimática.



Fonte: Marzzoco e Torres, 1999 p.68.

A Figura 3 apresenta um esquema do processo de catálise enzimática. Em (a) observa-se a enzima com o sítio ativo e as moléculas A e B de reagentes. Em (b) ilustra-se os reagentes alojados no sítio ativo da enzima. Em (c) a reação se processou e os produtos C e D foram formados. Em (d), os produtos da reação são liberados do centro ativo, e desse modo, a enzima regenerada poderá catalisar outra reação (MARZZOCO; TORRES, 1999).

### 3.3.2 Dosagem de Enzimas

Muitas vezes há necessidade de aferir a quantidade de uma enzima presente em soluções que contêm também outras proteínas, como é o caso do plasma sanguíneo. Marzzoco e Torres (1999, p.72), afirma sobre a dosagem de enzimas:

[...] a dosagem de enzimas é sempre feita através da medida de sua atividade, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, esta medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar essas dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substratos, para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas. A velocidade da reação é medida e expressa em Unidades Internacionais. Uma *Unidade Internacional (U)* é a quantidade de enzima capaz de formar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura etc.), especificadas para cada caso. As dosagens clínicas de enzimas no plasma e em outros fluídos são geralmente expressas em U/mL ou U/L (MARZZOCO; TORRES, 1999, p.72).

### 3.3.3 Inibidores Enzimáticos

Na maioria dos casos, a atividade das enzimas pode ser modulada através de alterações no pH e na temperatura:

[...] existem condições ótimas de pH e temperatura para que a enzima trabalhe em sua velocidade máxima. Em contrapartida, mudanças bruscas de pH podem inativar completamente uma enzima. A maioria das enzimas funcionais em animais superiores funciona em temperatura de 37°C, e temperaturas superiores a estas podem levar a inatividade de várias delas (LIEBERMAN et al., 2009 apud ZENKI, 2014, p.1).

Outro método para modular a atividade enzimática é através dos inibidores enzimáticos:

Inibidores são compostos que diminuem a velocidade de uma reação enzimática. Os mecanismos de inibição se baseiam em mimetizar ou participar em uma das etapas da reação catalítica, podendo reagir reversivelmente com grupos funcionais do sítio ativo ou mesmo distante deste sítio, causando alteração global da estrutura da enzima (LIEBERMAN et al., 2009 apud ZENKI, 2014, p.2).

Segundo Nelson e Cox (2014) existem basicamente dois mecanismos de inibição, sendo eles:

**Inibição reversível:** As moléculas de inibidores (I) diminuem a atividade enzimática por meio de interações reversíveis.

**Inibição irreversível:** Os inibidores, no caso chamados de inativadores, ligam-se tão fortemente à enzima, que bloqueiam permanentemente a atividade enzimática

Dentro da Inibição reversível existem três categorias de inibidores, definidas pelo seu modo de ação, são elas:

**Inibidores Competitivos:** São moléculas estruturalmente semelhantes ao substrato e competem com ele pelo sítio ativo da enzima.



**Inibidores Não-competitivos:** A molécula de inibidor se liga diretamente ao complexo enzima-substrato, mas não à enzima livre. Tal inibidor não precisa se assemelhar ao substrato, porém provoca uma distorção do sítio ativo da enzima, fazendo com que a mesma se torne cataliticamente inativa.



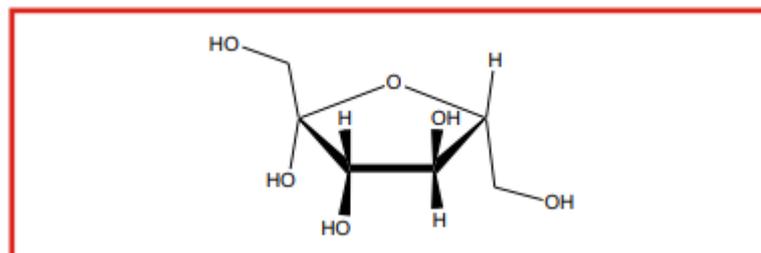
**Inibidores Mistos:** Tanto a enzima como o complexo enzima-substrato ligam o inibidor. O inibidor misto liga se a sítios da enzima envolvidos tanto na ligação do substrato como na catálise enzimática.



### 3.4 Açúcares: Sacarose, Glicose e Frutose

**Frutose:** encontrada principalmente nas frutas e no mel. É o mais doce dos açúcares simples. Fornece energia de forma gradativa, por ser absorvida lentamente, o que evita que a concentração de açúcar no sangue (glicemia) aumente muito depressa (PINHEIRO; PORTO; MENEZES, 2005, p.10).

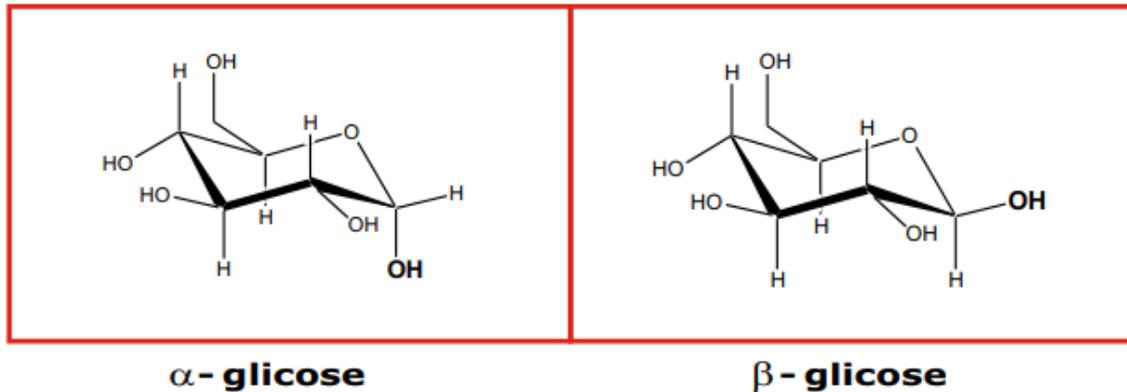
Figura 4 - Molécula de Frutose.



Fonte: Pinheiro; Porto; Menezes, 2005, p.10.

**Glicose:** resultado da "quebra" de carboidratos mais complexos, polissacarídeos, encontrados nos cereais, frutas e hortaliças. É rapidamente absorvida, sendo utilizada como fonte de energia imediata ou armazenada (PINHEIRO; PORTO; MENEZES, 2005, p.10).

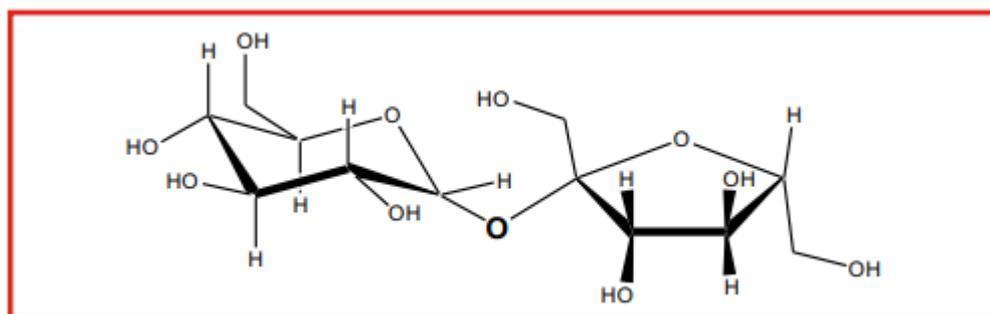
Figura 5 - Moléculas de  $\alpha$  e  $\beta$ -glicose.



Fonte: Pinheiro; Porto; Menezes, 2005, p.10.

**Sacarose:** encontrada na cana-de-açúcar e na beterraba. É o açúcar mais comum, açúcar branco, formado por glicose e frutose. Tem rápida absorção e metabolização, fornece energia imediata e contribui para a formação das reservas de glicogênio (PINHEIRO; PORTO; MENEZES, 2005, p.11).

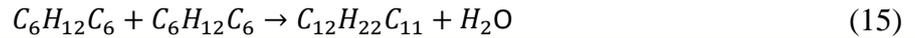
Figura 6 - Molécula de Sacarose.



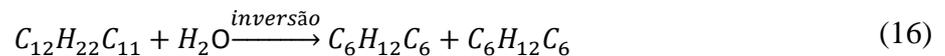
Fonte: Pinheiro; Porto; Menezes, 2005, p.11.

### 3.5 O Processo de Inversão da Sacarose

De acordo com Fogaça (2013, n.p) quando dois monossacarídeos reagem, eles formam um dissacarídeo, com a eliminação de uma molécula de água. Assim, quando a  $\alpha$ -glicose reage com a frutose, forma-se o açúcar comum ou sacarose, como mostrado a seguir:



Os dissacarídeos sofrem hidrólise liberando monossacarídeos, ou seja, essa reação de formação da sacarose pode ocorrer no sentido inverso, com a formação de uma mistura de glicose e frutose, que é chamada de açúcar invertido (FOGAÇA, 2013, n.p). A quebra da sacarose ocorre na ligação entre o núcleo de piranose e furanose, com a liberação de uma molécula de glicose e uma de frutose. Nesta reação, ocorre a absorção de água (MARIGNETTI & MANTOVANI, 1979/80 apud PODADERA, 2007, p.5).



O termo “xarope de açúcar invertido” descreve uma mistura de açúcares em solução, principalmente glicose, frutose e sacarose. Glicose e Frutose estas, obtidas através da reação de hidrólise da sacarose, denominada inversão (CHOU; JASOVISKY, 1993 apud POÇAS, 2004, p.54). O açúcar invertido recebe esse nome, devido a quebra da ligação glicosídica da sacarose com a formação de glicose e frutose. Enquanto a sacarose em solução tem rotação específica positiva, a glicose e a frutose juntas apresentam rotação específica negativa, daí o termo inversão (PODADERA, 2007).

Dois métodos podem ser usados para a produção do açúcar invertido: a hidrólise enzimática, catalisada pela enzima invertase e a hidrólise ácida, catalisada por um ácido (POÇAS, 2004).

A hidrólise ácida traz inconvenientes devido a formação de subprodutos que escurecem o xarope. A alternativa da hidrólise ácida, é realizar hidrólise enzimática da sacarose através da enzima invertase. Esse processo tem a vantagem de fornecer um produto de melhor qualidade, sem os inconvenientes da hidrólise ácida. Apesar da vantajosa, a inversão enzimática é pouco utilizada devido ao custo da enzima. A enzima utilizada é a invertase, disponível no mercado é obtida através da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo uma enzima produzida intracelularmente (CONTIERO et al, 1992, p.1).

A técnica de inversão da sacarose é uma estratégia utilizada na fabricação de alimentos como: confeitos, na panificação e produtos afins, na formulação de cremes para recheio e de geleias, pois, este produto tem alto poder edulcorante e cristalização lenta, melhorando a textura e o sabor dos alimentos (SAID & PIETRO, 2004 apud NOVAKI, 2010).

Quando a inversão é realizada diretamente no alimento, como por exemplo, na produção de centros macios em balas, utiliza-se o método enzimático (PODADERA, 2007).

Esse também é o método utilizado para bombons com recheio pastoso. Durante o processo de fabricação, o bombom é recheado com uma pasta de sacarose, água e invertase. Até a sua venda, ocorrerá, no interior do bombom, a inversão da sacarose com formação de uma mistura de glicose e frutose (CHEMELLO, 2006 apud PODADERA, 2007, p.6).

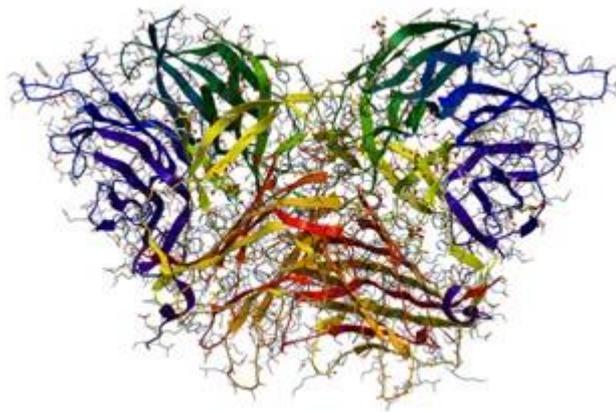
As especificações do açúcar invertido permitem relativa flexibilidade na escolha da matéria-prima para sua fabricação. Algumas matérias-primas que podem ser utilizadas como alternativa para a sacarose são: melado de cana de beterraba, tâmaras, uvas e xarope de milho por isomerização enzimática (MARIGNETTI & MANTOVANI, 1979/80; MOROZ et al., 1973 apud PODADERA, 2007, p.7).

### 3.5.1 A Enzima Invertase

A enzima intracelular da *S. cerevisiae* de interesse nesse estudo é a  $\beta$ -frutofuranosidase, também chamada de Invertase ou Sacarase, sendo também encontrada em invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos. A invertase, como já mencionado no item 2.5, é responsável pela hidrólise da sacarose na formação de açúcar invertido (NOVAKI, 2010).

O uso da invertase está principalmente relacionado à indústria alimentícia, tanto na fabricação do xarope de glicose e frutose (açúcar invertido) quanto com a formação dos frutooligossacarídeos (SAID & PIETRO, 2004 apud NOVAKI, 2010, p.132). Devido a essa utilidade, a Invertase possui um alto poder industrial. O que limita a produção em massa dessa enzima tem sido basicamente o elevado custo em sua produção e o baixo rendimento obtido nos processos de extração e purificação da enzima (DIAS et al., 2018, p.355).

Figura 7 – Estrutura tridimensional da enzima invertase.



Fonte: Fogaça (2013).

### 3.6 Métodos de Rompimento

Em microbiologia, alguns produtos de nosso interesse, tais como enzimas, se encontram aprisionados intracelularmente. O processo de ruptura celular é de extrema importância para o acesso a esses produtos.

A ruptura celular é a primeira etapa no processo de isolamento de materiais intracelulares e constitui uma etapa essencial no processo de "*downstream*", possuindo considerável influência não somente na quantidade total da proteína de interesse a ser recuperada, mas também na sua atividade biológica, sua associação com outros componentes celulares e a possível presença de degradação proteolítica e contaminantes que podem [...] [...] influenciar nas etapas subsequentes de purificação. O processo de ruptura celular constitui o fator chave na produção e purificação de enzimas intracelulares, o qual tem um importante efeito na recuperação e qualidade do extrato proteico obtido (BECERRA et al., 2001 apud MEDEIROS et al, 2008).

Partindo de uma suspensão de células, é possível isolar produtos de interesse de forma individual quando se processa previamente a biomassa com um tratamento adequado para promover a ruptura celular (WAGNER, SCENI; RAMBALA, 2008 apud MACHADO JÚNIOR, 2014, p.14). O conhecimento da estrutura da parede celular é de extrema importância na seleção do processo de ruptura (THAMMAKITTI et al., 2004 apud MACHADO JÚNIOR, 2014, p.14).

Existem diferentes estruturas de paredes celulares e essas diferenças impactam diretamente no processo de rompimento. As células animais possuem membranas frágeis e fáceis de serem rompidas, enquanto que as bactérias, leveduras e outras formas de fungos possuem paredes rígidas e que exigem elevadas tensões de cisalhamento para serem rompidas (WHEELWRIGHT, 1991 apud SCHMIDELL, 2001, p.501). Devido ao tamanho maior e à diferença na estrutura da parede celular, a ruptura de leveduras em geral é mais fácil que a ruptura de bactérias (BECERRA et al., 2001; GECIOVA; DEAN; JELEN, 2002 apud MEDEIROS et al., 2008, n.p).

Além disso, é importante destacar a importância da localização do produto de interesse, para a correta determinação do protocolo de extração. Cada microrganismo possui características individuais quanto à localização das enzimas intracelulares que produz, desse modo, uma enzima de interesse pode estar no citoplasma, no peri-plasma ou, ainda, estar armazenada no interior de alguma organela célula (ASENJO; ANDREWS; HUANG, 1991 apud MEDEIROS et al., 2008, n.p).

As técnicas disponíveis para liberação de produtos intracelulares incluem processos mecânicos, físicos (ou não mecânicos), químicos e enzimáticos. Estes métodos podem ser realizados de forma separada, mas a combinação de dois ou mais deles pode melhorar a eficiência da ruptura (THAMMAKITTI et al., 2004 apud MACHADO JÚNIOR, 2014).

Os métodos de rompimento celular podem ser classificados como: mecânicos (homogeneizador de alta pressão, moinho de bolas, ultrassom), não mecânicos (choque osmótico, congelamento e descongelamento, secagem); químicos (álcalis, solventes, detergentes e ácidos) e enzimáticos (lise enzimática ou inibição da síntese da parede celular) (SCHUTE & KULA, 1990 apud SCHMIDELL, 2001, p.502).

Para se definir o processo de rompimento a ser empregado, alguns fatores são levados em consideração, como: rendimento, especificidade, necessidade de controle de temperatura, custo da operação unitária e capital investido (SCHUTE & KULA, 1990; WHEELWRIGHT, 1991 apud SCHMIDELL, 2001, p.502).

Embora existam muitos exemplos específicos de rompimento celular e por processos químicos e enzimáticos, são os métodos mecânicos que têm sido utilizados industrialmente (HARRISON, 1994; VERRAL & HUDSON, 1987 apud SCHMIDELL, 2001, p.503). Em geral, métodos mecânicos não são específicos, mas possuem alta eficiência e ampla aplicação em comparação com outros métodos.

O método de ruptura mecânica tem sido muito utilizado, principalmente quando se deseja obter produtos (extratos proteicos) com boas propriedades funcionais, permitindo recuperação eficiente da proteína mais próxima ao seu estado nativo, pois evita o uso de tratamentos térmicos drásticos, ajustes de pH e adição de reagentes químicos (HEDENSKOG & MOGREN, 1973 apud JÚNIOR ; ARÉVALO, 2001, p.55).

A desintegração mecânica pode ser conduzida por vários meios, como homogeneizador convencional, desintegrador de alta pressão, exposição ao ultrassom e desintegrador tipo moinho de bolas (ENGLER, 1979 apud JÚNIOR; ARÉVALO, 2001, p.55). O tamanho e a forma das células, assim como a estrutura da parede celular, são fatores determinantes para a definição do tipo de processo a ser utilizado para o rompimento celular mecânico. (HARRISON, 1994; VERRAL & HUDSON, 1987 apud SCHMIDELL, 2001, p.503).

O grau de pureza necessário na enzima depende de sua aplicação final e será determinado pelas características físico-químicas, propriedades biológicas, fonte da qual a

enzima está sendo purificada e tecnologia de purificação disponível (KILIKIAN & PESSOA JR.,2001 apud NOVAKI, 2009, p.2).

Após a extração, as enzimas podem ser separadas e purificadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação desses e de outros métodos (KILIKIAN & PESSOA JR., 2001 apud NOVAKI, 2009, p.2).

### 3.6.1 Rompimento por Moinho de Bolas

O rompimento mecânico com esferas de vidro (moinho de bolas) e o rompimento por ultrassom, devido a sua eficiência, destacam-se entre os métodos de ruptura, estando entre os mais utilizados durante o estabelecimento de processos de *downstream* (MEDEIROS et al., 2008).

O moinho de bolas, originalmente utilizado nas indústrias de tintas, foi adaptado com sucesso para o rompimento celular, tanto em laboratório quanto industrialmente. É um método simples e efetivo para o rompimento celular de diferentes tipos de micro-organismos (MACHADO JUNIOR, 2014, p.15).

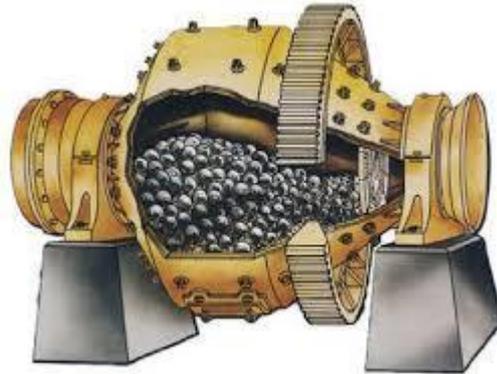
Neste método, utilizam-se pérolas de vidro em um recipiente contendo a suspensão celular. O rompimento celular ocorre a partir do choque de esferas com a biomassa, o que promove transferência de energia e consequente rompimento das células. (TAMER; MOO-YOUNG; CHISTI, 1998 apud QUINES et al.,2015, n.p). O material mais utilizado nas esferas é o vidro, mas também são usados materiais como o aço, o inox e a cerâmica. Quanto menor o diâmetro da esfera, mais eficiente é o rompimento (MARINELLO,2013, n.p).

Marinello (2013, n.p) faz a seguinte descrição para o funcionamento do mecanismo do moinho de bolas:

O moinho de bolas é constituído por uma câmara cilíndrica fechada, horizontal ou vertical, um sistema de refrigeração e um eixo que gira em alta rotação. Nessa câmara são adicionadas esferas de vidro e células em suspensão. Ao longo do eixo de rotação estão distribuídos um ou mais discos ou hastes que giram em alta velocidade e provocam atrito entre as esferas e as células intactas e causam rompimento celular. O rompimento ocorre devido à força de cisalhamento aplicada pelas esferas de vidro contra a parede celular das células. As condições de rompimento nesse equipamento são facilmente controláveis e a eficiência do processo depende da geometria da câmara de rompimento, da velocidade e do tipo de agitador, do tamanho das esferas, da carga de esferas e da concentração celular, da velocidade de alimentação e da temperatura (MARINELLO,2013, n.p).

A figura 8 apresenta o esquema de um Moinho de Bolas industrial:

Figura 8 –Moinho de Bolas.



Fonte: Silva, 2014, p.19.

Fatores determinantes para a eficiência do processo de ruptura por moinho de bolas são o diâmetro das esferas e da carga de partículas processadas. Geralmente, uma carga de 80-90% do volume do compartimento de abrasão é considerada ótima (MIDDELBERG, 1995 apud MACHADO JUNIOR, 2014). Outro fator relevante é a velocidade de agitação, visto que influencia o número de contatos entre as células e as esferas. Quanto maior a velocidade de rotação, mais contato entre células e esferas é proporcionado e desse modo, o rompimento celular se torna mais rápido. O tipo de agitador também influencia a eficiência de rompimento. Existem agitadores dos mais diversos tipos, podem estar dispostos no eixo central ou fora dele, perpendicular ou oblíquo. Para auxiliar na agitação eles podem conter sulcos, pequenos cortes ou furos (MARINELLO, 2013).

Além disso, vários outros parâmetros podem influenciar nos resultados do moinho de bolas, tais como: geometria da câmara de rompimento, tempo de residência, forças de cisalhamento, tipo de microrganismo e concentração da suspensão celular (CHISTI; MOOYOUNG, 1986; GARRIDO et al., 1994 apud QUINES et al., 2015).

Além da alta eficiência proporcionada, outra vantagem no processo de rompimento por esferas de vidro, é que o mesmo não necessita de grande aparato operacional. Basicamente, são utilizadas pérolas de vidro em um tubo, contendo suspensão celular (MEDEIROS et al., 2008).

Já a desvantagem deste método está na grande quantidade de fatores interferentes, como por exemplo: geometria da câmara de rompimento, da velocidade e do tipo de agitador, do tamanho, diâmetro e quantidade de esferas, da concentração celular (CHISTI; MOOYOUNG, 1986; GARRIDO et al., 1994 apud QUINES et al., 2015).

### 3.6.2 Rompimento por Choque Osmótico

Métodos não mecânicos de rompimento de células são adequados para a recuperação de biomoléculas sensíveis à tensão de cisalhamento ou pressão de trabalho geradas pelos métodos mecânicos (SCHMIDELL, 2001, p.502). Nesse sentido, uma das técnicas de rompimento mais utilizadas é a do Choque Osmótico:

O mecanismo de rompimento é baseado no fato de que a pressão osmótica interna rompe a membrana, ou parte dela, permitindo que o conteúdo intracelular seja liberado para o meio externo. As vantagens desse mecanismo são: fácil controle do pH e da temperatura do meio, baixo investimento de capital, alta especificidade para degradação da parede celular (MACHADO JUNIOR, 2014, p.18).

Alguns agentes que podem ser utilizados nesse processo de rompimento são solução tampão de fosfato, ou acetato, ou ainda com água destilada. A extração pode ser realizada apenas com adição desses solventes, mas também associando os métodos químicos aos físicos, como congelamento/ descongelamento, maceração, digestão, ultrassom, homogeneização por pressão (CHEN, et al. 2006; PATEL, et al. 2005; PATIL, et al. 2006; SUN, et al., 2006 apud MONKS, 2012).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Determinação da Curva Padrão para a Glicose

Com o intuito de determinar a Curva Padrão para a Glicose foram feitas sete soluções de Glicose com as seguintes concentrações: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 e 2 g/L.

Em um tubo de ensaio identificado, adicionou-se 1mL de solução de glicose 0,2 g/L e 1mL de 3,5-DNS. Foi repetido esse procedimento para as demais concentrações de glicose. Também foi preparada e identificada uma amostra em branco, para isso adicionou-se em um tubo de ensaio 1mL de água destilada e 1mL de 3,5-DNS. Em seguida os tubos foram transferidos para banho termostático (Warmnest, modelo HH-S18) a 95 °C por cinco minutos. Após esse tempo, os tubos foram transferidos para banho de gelo, e adicionado a cada um deles 10mL de água destilada fria (MILLER,1959).

Foi realizada a leitura espectrofotométrica (Espectrofotômetro visível Bel, modelo V-M5) das amostras em um comprimento de onda de 540nm. Para o funcionamento correto do espectrofotômetro, inseriu-se no equipamento primeiro a amostra em branco (contendo apenas

água destilada e 3,5-DNS). Após isso, puderam ser inseridas cada uma das amostras e anotadas as absorvâncias aferidas.

De posse das concentrações das soluções de glicose utilizadas e das respectivas absorvâncias obtidas foi possível traçar a Curva Padrão para a Glicose.

#### 4.2 Método do Moinho de Bolas

Com o auxílio de uma balança analítica, pesou-se em 6 tubos do tipo “*falcon*” (tubos de centrífuga de 25 mL) aproximadamente 1g de levedura *Sacharomyces Cerevisiae* na forma de fermento biológico seco da marca Fleischmann<sup>®</sup>. A balança foi então tarada, e adicionado 1g de esferas de vidro e 5 mL de água destilada.

Com a finalidade de simular a ação de um moinho de bolas usou-se um agitador do tipo Vórtex (Satra, modelo Éven Vk-28), onde as amostras permaneceram sob agitação nos tempos de 1, 5 e 10 minutos.

Ao fim da agitação, os tubos foram levados a centrífuga com uma rotação de 3000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, é possível observar duas fases bem distintas: concentrado e sobrenadante. Os sobrenadantes (extrato enzimático) foram retirados com auxílio de uma pipeta automática e armazenados em tubos “*ependorf*” (tubos de micro centrífuga de 2 mL) para posterior medição da atividade enzimática.

Figura 9 - Tubo no agitador Vórtex.



Fonte: Do autor (2020).

Foi realizada a repetição desse experimento para quantidade de esferas de vidro de 3 e 5g, também nos tempos de extração 1, 5 e 10 minutos. Dessa forma foram obtidas as seguintes amostras:

**Tabela 1 - Combinações de Tempo e Quantidade de Esferas das amostras avaliadas.**

Tempo de Extração (min)	Esferas (g)
1	1
	3
	5
5	1
	3
	5
10	1
	3
	5

Fonte: Tabela construída pelo autor.

### 4.3 Método do Choque Osmótico

Primeiramente, foi necessário preparar uma solução de Bicarbonato de Sódio 0,1 M. Para tanto, com base na massa molar do Bicarbonato (84,07 g/mol), pesou-se uma massa de 0,8407 g do mesmo, que foi em seguida solubilizado em água destilada. Em seguida transferiu-se a solução para um balão de 100 mL que foi completado até o menisco com água destilada.

Foi também necessário preparar a solução de Sacarose 0,01 M. Para tanto, com base na massa molar da Sacarose (342,2965 g/mol), pesou-se uma massa de 0,3423 g da mesma, que foi em seguida solubilizada em água destilada. Em seguida, transferiu-se a solução para um balão de 100 mL que foi completado até o menisco, também com água destilada.

Com o auxílio de uma balança analítica, pesou-se em seis tubos do tipo “falcon” aproximadamente 1 g de levedura *Sacharomyces Cerevisiae* na forma de fermento biológico seco da marca Fleischmann®.

Da solução de Bicarbonato, retirou-se 5 mL que foram colocados em cada tubo tipo “falcon”, que já continham 1 g levedura. Os tubos foram fechados e levados a um agitador do

tipo Vórtex, para que as soluções fossem homogeneizadas. Em seguida, as amostras foram levadas para um banho maria (Warmnest, modelo HH-S18), com temperatura de 37 °C e retiradas duas a duas do banho (teste em duplicata) na sequência de 1, 5 e 10 minutos. Após a retirada, as amostras foram mantidas em banho de gelo por cinco minutos para serem resfriadas.

Ao fim da retirada de todos os tubos e resfriamentos dos mesmos, as amostras foram levadas a centrífuga da marca Fanem, modelo Excelsa i 2206, por cinco minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, é possível observar duas fases bem distintas: concentrado e sobrenadante. Os sobrenadantes (extrato enzimático) foram retirados com auxílio de uma pipeta automática e armazenados em tubos “*ependorf*” para posterior análise da atividade enzimática.

Foi realizada a repetição desse experimento para soluções de Bicarbonato com concentrações de 0,5 e 1 M, também nos tempos de extração 1, 5 e 10 minutos. Dessa forma foram obtidas as seguintes combinações, conforme mostra a Tabela 2:

**Tabela 2 - Combinações de Tempo e Concentração de Bicarbonato das amostras avaliadas.**

<b>Tempo de Extração (min)</b>	<b>Bicarbonato de Sódio (M)</b>
1	0,1
	0,5
	1,0
5	0,1
	0,5
	1,0
10	0,1
	0,5
	1,0

Fonte: Tabela construída pelo autor.

#### 4.4 Quantificação de Glicose

Primeiramente foi necessário preparar uma solução de Sacarose 0,01 M. Para tanto, com base na massa molar da Sacarose (342,2965 g/mol), pesou-se uma massa de 0,3423g da mesma, que foi solubilizada em água destilada. Em seguida, transferiu-se a solução para um balão de 100ml que foi completado até o menisco, também com água destilada.

Foram preparados 36 tubos de ensaio contendo 1,8 mL de água destilada e 0,7 mL de solução de Sacarose 0,01 M cada. Foram adicionados 100 µL do extrato enzimático de cada amostra em diferentes tubos, que foram então identificados quanto ao método de rompimento utilizado e condições avaliadas (tempo de extração, quantidade de esferas ou bicarbonato). Também foi preparada e identificada uma amostra do branco, para isso adicionou-se em um tubo de ensaio 2,6 mL de água destilada. Com todos os componentes nos tubos, estes foram agitados e deixados em reação por 5 minutos.

Em seguida, adicionou-se 1mL de solução 3,5-DNS em cada tubo e novamente foram colocadas as amostras em banho térmico, agora na temperatura de 95 °C por 5 minutos. Após esse tempo, os tubos foram transferidos para banho de gelo, e adicionado a eles 10mL de água destilada fria (MILLER, 1959).

Com os tubos já homogeneizados, foi realizada a leitura espectrofotométrica (Espectrofotômetro visível Bel, modelo V-M5) em comprimento de onda de 540 nm. Para o funcionamento correto do espectrofotômetro, inseriu-se no equipamento primeiro a amostra em branco (contendo apenas água destilada e 3,5-DNS). Após isso, puderam ser inseridas as amostras e anotadas as absorbâncias aferidas.

#### **4.5 Procedimento de Diluição**

É necessário que a absorbância lida no espectrofotômetro se encontre dentro dos limites da Curva Padrão da Glicose para posteriormente, realizar-se o correto cálculo da concentração de glicose e atividade enzimática respectivamente. Ao se ultrapassar esse limite é preciso realizar uma diluição das amostras, a fim de que se encaixem no intervalo estipulado.

Em um primeiro teste falho, foi verificado que as amostras do Método de Choque Osmótico extrapolaram os limites da Curva Padrão de Glicose (Figura 10). Por isso, tornou-se necessária a realização de um novo teste, dessa vez realizando o procedimento de diluição.

Para tanto, após ocorrido o tempo reacional de cinco minutos, foram retirados de cada tubo de ensaio (contendo água destilada + solução de Sacarose + extrato enzimático) 100 µL. Esses conteúdos retirados foram então dispostos em outros tubos de ensaio e adicionados a cada um deles 900 µL de água destilada.

Em seguida, adicionou-se 1mL da solução de 3,5-DNS em cada tubo e novamente foram colocadas as amostras em banho térmico, agora na temperatura de 95 °C por 5 minutos. Após

esse tempo, os tubos foram transferidos para banho de gelo, e adicionado a eles 10 mL de água destilada fria. Desse modo, foi possível realizar a leitura espectrofotométrica normalmente.

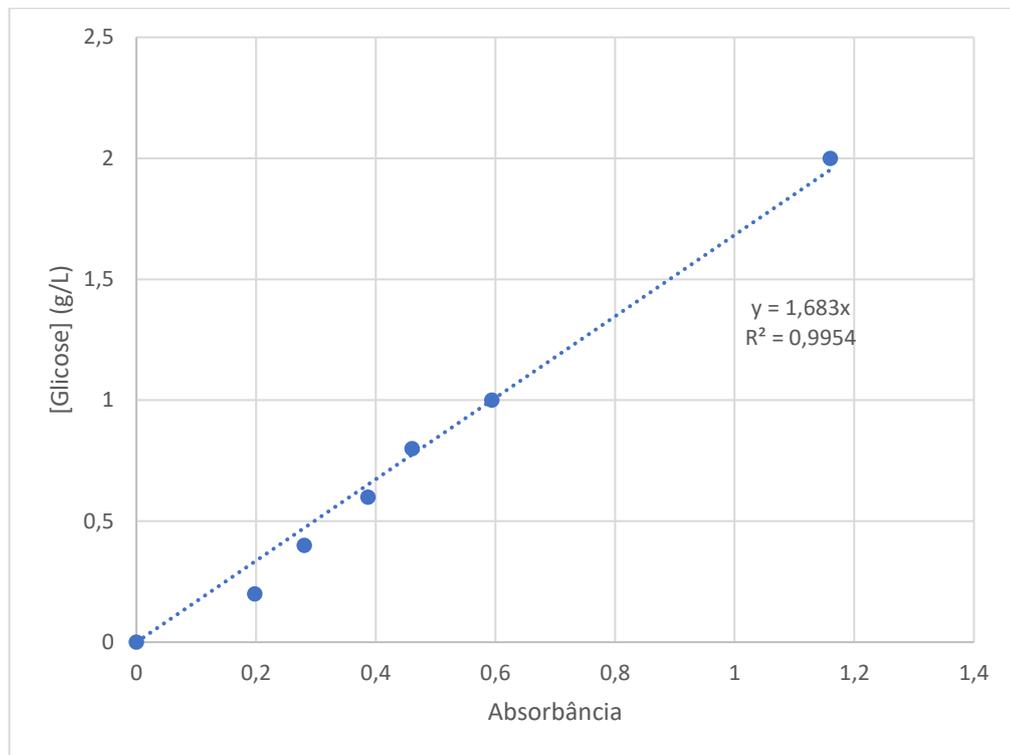
Como foi realizada uma diluição de dez vezes, ao final do cálculo da atividade enzimática a mesma deverá ser multiplicada por dez.

## 5 RESULTADOS E DICUSSÕES

### 5.1 Curva Padrão para a Glicose

A partir dos resultados obtidos para a absorvância das amostras com diferentes concentrações de glicose, foi possível construir a Curva Padrão para a Glicose e realizar a sua linearização.

Figura 10 - Curva Padrão da Glicose.



Fonte: Do autor (2020).

A lei de D'Alembert afirma que a relação entre a concentração e a absorvância é linear, dessa forma, deve-se desprezar o coeficiente linear, de modo que em uma concentração nula, a absorvância também seja nula.

Dessa forma, a linearização da curva fornece uma equação da reta de  $y = 1,683x$ , em que  $y$  representa a concentração de glicose e  $x$  a absorvância. Através dessa equação, e a partir

das absorvâncias medidas experimentalmente, é possível determinar as concentrações de glicose nas amostras provenientes dos Métodos de Moinho de Bolas e Choque Osmótico.

$$[Glicose]=1,683*[absorbância] \quad (17)$$

## 5.2 Concentração de Glicose

Através da Equação (17) e a partir das absorvâncias medidas experimentalmente, é possível determinar as concentrações de glicose nas amostras. A seguir, apresenta-se para efeito de ilustração, a linha de cálculo para a amostra do Moinho de Bolas referente ao tempo de extração de um minuto e um grama de esferas de vidro:

$$[Glicose]=1,683*[absorbância]$$

$$[Glicose]=1,683*[0,1160]$$

$$[Glicose] = 0,195 \text{ g/L}$$

$$[Glicose] = \frac{0,195 \text{ g/L}}{180,156 \times 10^{-6} \text{ g/}\mu\text{mol}} = 1083,66 \mu\text{mol/L}$$

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para concentração de glicose com o Método do Moinho de Bolas nos diferentes tempos de extração e quantidade de esferas de vidro utilizadas:

**Tabela 3 - Valores da Concentração de Glicose para o método do Moinho de Bolas.**

TEMPO (min)	[GLICOSE] $\mu\text{mol/L}$		
	1g	3g	5g
1	1083,661 $\pm$ 0,002	1177,080 $\pm$ 0,006	1354,576 $\pm$ 0,001
5	1158,396 $\pm$ 0,004	1321,879 $\pm$ 0,003	1396,615 $\pm$ 0,000
10	1415,298 $\pm$ 0,002	1415,298 $\pm$ 0,001	1499,376 $\pm$ 0,001

Fonte: Tabela construída pelo autor.

O menor valor atingido para a concentração de glicose foi de 1083,661  $\mu\text{mol/L}$  que se deu no tempo de 1 minuto e 1 g de esferas. Já o maior valor foi de 1499,376  $\mu\text{mol/L}$  que se deu no tempo de 10 minutos e 5 g de esferas. A diferença entre o menor e maior valor atingido é de 38,36%.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para concentração de glicose com o Método do Moinho de Bolas nos diferentes tempos de extração e concentrações de bicarbonato utilizadas:

**Tabela 4 - Valores da Concentração de Glicose para o método do Choque Osmótico.**

TEMPO (min)	[GLICOSE] $\mu\text{mol/L}$		
	0,1M	0,5M	1M
1	8361,004 $\pm$ 0,011	3190,260 $\pm$ 0,009	2256,069 $\pm$ 0,008
5	8870,137 $\pm$ 0,013	3643,342 $\pm$ 0,005	2592,378 $\pm$ 0,001
10	9841,695 $\pm$ 0,064	4255,237 $\pm$ 0,048	2723,165 $\pm$ 0,006

Fonte: Tabela construída pelo autor.

O menor valor atingido para a concentração de glicose foi de 2256,069  $\mu\text{mol/L}$  que se deu no tempo de 1 minuto e 1 M de bicarbonato. Já o maior valor foi de 9841,695  $\mu\text{mol/L}$  que se deu no tempo de 10 minutos e 0,1 M de bicarbonato. A diferença entre o menor e maior valor atingido é de 336,22%, sendo muito expressiva.

### 5.3 Atividade Enzimática

Foi determinada a atividade da enzima para todas as amostras realizadas em cada um dos métodos abordados. Para isso foi necessário conhecer o volume reacional e a velocidade de reação. O volume reacional é o volume da solução onde ocorre a inversão da sacarose, no caso, composto por 1,8 mL de água, 0,7 mL de solução de sacarose e 0,1 mL de extrato enzimático. Já a velocidade da reação, pode ser definida como  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto de reação (lembrando que o tempo reacional foi de 5 minutos). Uma unidade de atividade (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima (em mL) necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto. Para calcular o valor da atividade, dividiu-se a velocidade da reação pelos 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. A seguir apresenta-se para efeito de ilustração, a linha de cálculo para a atividade da amostra referente ao Método de Moinho de Bolas com tempo de extração de um minuto e 1 g de esferas de vidro:

$$V_{reacional} = 1,8 + 0,7 + 0,1 = 2,6ml$$

$$n = [Glicose] * V_{reacional} = 1083,661 \mu\text{mol/L} * 0,0026L = 2,817\mu\text{mol}$$

$$r_{glicose} = \frac{\Delta glicose}{\Delta tempo} = \frac{2,817}{5} = 0,5635 \mu\text{mol/min}$$

$$\text{Atividade} = \frac{r_{glicose}}{V_{extrato\ enzimático}} = \frac{0,5635}{0,1} = 5,635 \text{ U/mL}$$

Nesse caso, por se tratar de uma amostra do Método do Moinho de Bolas que sofreu uma diluição de dez vezes, o resultado deve ser multiplicado por dez:

$$\text{Atividade} = 5,635 * 10 = 56,35 \text{ U/mL}$$

### 5.3.1 Atividade Enzimática nos Diferentes tempos de Extração e Quantidade de Esferas

A Tabela 5, apresenta os resultados obtidos para atividade enzimática nos diferentes tempos de extração e quantidade de esferas de vidro utilizadas:

**Tabela 5 - Valores da Atividade Enzimática para o método do Moinho de Bolas.**

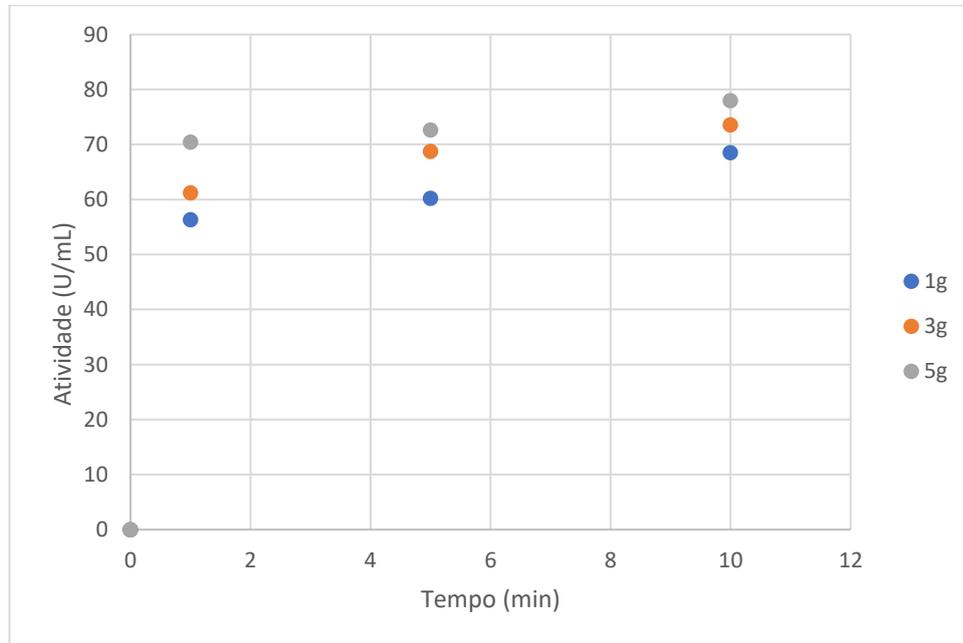
TEMPO (min)	ATIVIDADE (U/mL)		
	1g	3g	5g
1	56,351 ± 0,002	61,208 ± 0,006	70,438 ± 0,001
5	60,237 ± 0,004	68,738 ± 0,003	72,624 ± 0,000
10	68,495 ± 0,002	73,595 ± 0,001	77,968 ± 0,001

Fonte: Tabela construída pelo autor.

O menor valor atingido para a atividade foi de 56,351 U/mL que se deu no tempo de 1 minuto e 1g de esferas. Já o maior valor foi de 77,968 U/mL que se deu no tempo de 10 minutos e 5 g de esferas. A diferença entre o menor e maior valor atingido, assim como para concentração de glicose, também é de 38,36%. Assim, observa-se que a combinação que atinge o maior resultado, inclui o maior tempo de extração e a maior quantidade de esferas.

Os dados apresentados na Figura 11 apresentam a relação entre a atividade enzimática com o tempo e quantidade de esferas de vidro utilizadas:

Figura 11 - Dados da Atividade Enzimática pelo Tempo para o Moinho de Bolas.



Fonte: Do autor (2020).

Observando os dados da Figura 11, bem como da Tabela 5 é possível observar que a atividade aumenta com o aumento do tempo de extração para todas as quantidades de esferas utilizadas. É importante ressaltar o aumento rápido e expressivo da atividade no primeiro minuto de extração, apresentando um crescimento linear. Após esse intervalo de tempo, a atividade continua aumentando, porém em uma menor taxa. Como a atividade é uma medida indireta da concentração enzimática, pode-se afirmar então, que o rompimento celular ocorre principal e efetivamente no primeiro minuto de extração.

Para a quantidade de 1 g de esferas é possível observar um aumento na atividade de 6,90% com a mudança no tempo de extração de 1 para 5 minutos e de 21,55% com mudança no tempo de extração de 1 para 10 minutos.

Para a quantidade de 3 g de esferas é possível observar um aumento na atividade de 12,30% com a mudança no tempo de extração de 1 para 5 minutos e de 20,24% com a mudança no tempo de extração de 1 para 10 minutos.

Para a quantidade de 5 g de esferas é possível observar um aumento na atividade de 3,10% com a mudança no tempo de extração de 1 para 5 minutos e de 10,69% com a mudança no tempo de extração de 1 para 10 minutos.

É notável o superior aumento da porcentagem relativa da atividade, quando o tempo é decuplicado, em relação ao tempo quintuplicado. Isso demonstra a importância do fator tempo para ruptura celular e consequente obtenção de enzimas. Para as quantidades de 1 g e 5 g de esferas, o aumento é cerca de 3 vezes maior para o tempo de 10 minutos em comparação com o tempo de 5 minutos.

Entretanto é necessário cautela ao avaliar esses resultados, verificando sempre se o ganho enzimático é compatível com o aumento no tempo de extração. Como exemplo, para a quantidade de 5 g de esferas por exemplo, no tempo de 1 minuto a atividade obtida foi de 70,438 U/mL, enquanto que para o tempo de 5 minutos obteve-se uma atividade de 72,624 U/mL. Um aumento de 3,10% como citado anteriormente. Ou seja, significa quintuplicar os esforços e o tempo de espera, para aumentar em apenas 3,10% a quantidade de enzima obtida.

Outro dado importante na análise de viabilidade é a quantidade de esferas utilizadas. A partir do gráfico da Figura 11, bem como os dados da Tabela 5, é possível observar o aumento da atividade com o aumento da quantidade de esferas para todos os tempos de extração.

Para o tempo de extração de 1 minuto é possível observar um aumento na atividade de 8,62% com mudança da quantidade de esferas de 1 g para 3 g e de 25% com a mudança da quantidade de esferas de 1g para 5g.

Para o tempo de extração de 5 minutos é possível observar um aumento na atividade de 14,11% com a mudança na quantidade de esferas de 1 g para 3 g e de 20,56% com a mudança da quantidade de esferas de 1 g para 5 g.

Para o tempo de extração de 10 minutos é possível observar um aumento na atividade de 7,45% com a mudança da quantidade de esferas de 1 g para 3 g e de 13,83% com a mudança da quantidade de esferas de 1 g para 5 g.

Observa-se que o aumento na atividade foi superior ao se quintuplicar a quantidade de esferas em relação aos valores obtidos ao se triplicar essa quantidade. É notável, que aumentando a quantidade de esferas, é possível obter no tempo 1 minuto resultados superiores ao tempo de 10 minutos com menor quantidade de esferas.

### **5.3.2 Atividade Enzimática nos Diferentes tempos de Extração e Concentrações de Bicarbonato**

A Tabela 6, apresenta os resultados obtidos para atividade enzimática nos diferentes tempos de extração e concentrações de bicarbonato:

**Tabela 6 - Valores da Atividade para o método do Choque Osmótico.**

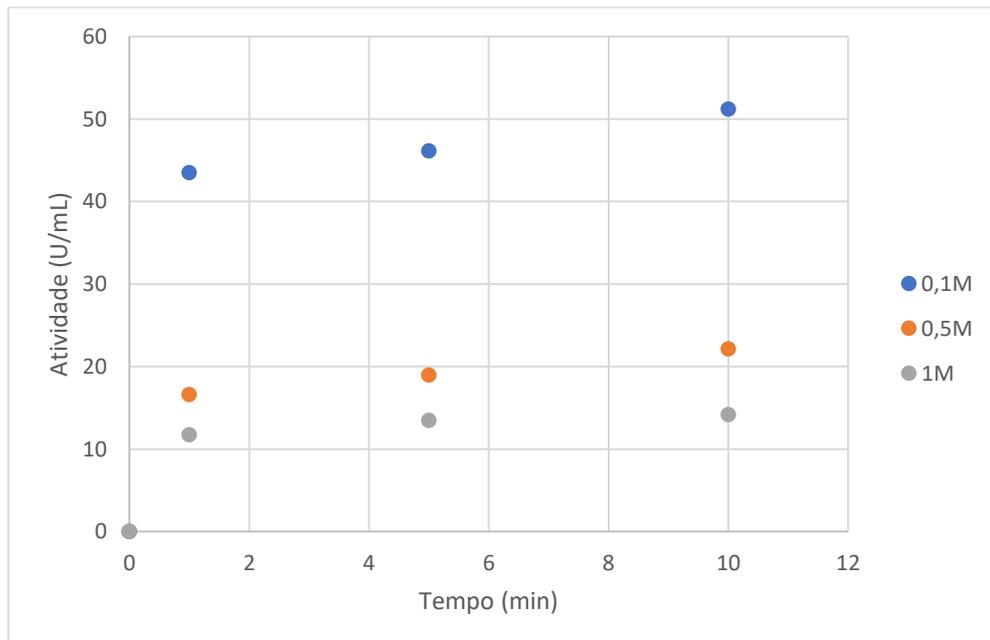
TEMPO (min)	ATIVIDADE (U/mL)		
	0,1M	0,5M	1M
1	43,477 ± 0,011	16,589 ± 0,009	11,732 ± 0,008
5	46,125 ± 0,013	18,945 ± 0,005	13,480 ± 0,001
10	51,177 ± 0,064	22,127 ± 0,048	14,160 ± 0,006

Fonte: Tabela construída pelo autor.

O menor valor atingido para a atividade foi de 11,732 U/mL que se deu no tempo de 1 minuto e 1 M de bicarbonato. Já o maior valor foi de 51,177 U/mL que se deu no tempo de 10 minutos e 0,1 M de bicarbonato. A diferença entre o menor e maior valor atingido, assim como para concentração de glicose, também é de 336,22%. Um aumento muito expressivo. Assim, observa-se que a combinação que atinge o maior resultado, inclui o maior tempo de extração e a menor concentração de bicarbonato.

Os dados apresentados na Figura 12 apresentam a relação entre a atividade enzimática com o tempo e concentração de bicarbonato utilizadas:

Figura 12 - Dados da Atividade Enzimática pelo Tempo para o Choque Osmótico.



Fonte: Do autor (2020).

Analisando os dados da Figura 12, bem como da Tabela 6, é possível observar o aumento da concentração de glicose com o aumento do tempo de extração para todas as concentrações de bicarbonato utilizadas.

Para a concentração de 0,1 M de bicarbonato é possível observar um aumento na atividade de 6,09% com a mudança no tempo de extração de 1 para 5 minutos e de 17,70% com a mudança no tempo de extração de 1 para 10 minutos.

Para a concentração de 0,5 M de bicarbonato é possível observar um aumento na atividade de 14,20% com a mudança no tempo de extração de 1 para 5 minutos e de 33,38% com a mudança no tempo de extração de 1 para 10 minutos.

Para a concentração de 1 M de bicarbonato é possível observar um aumento na atividade de 14,91% com a mudança no tempo de extração de 1 para 5 minutos, e de 20,70% com a mudança no tempo de extração de 1 para 10 minutos.

É notável o superior aumento da porcentagem relativa da atividade, quando o tempo é decuplicado em relação ao tempo quintuplicado. Desse modo, podemos inferir que o fator tempo, é um elemento que atua a favor do rompimento celular.

Outro dado importante na análise de viabilidade é a concentração de bicarbonato utilizada. A partir os dados da Figura 12, bem como da Tabela 6, é possível observar um decréscimo na concentração de glicose com o aumento da concentração de bicarbonato.

Para o tempo de extração de 1 minuto é possível observar uma diminuição na atividade de 61,84% com a mudança na concentração de bicarbonato de 0,1 M para 0,5 M e de 73,02% com a mudança da concentração de bicarbonato de 0,1 M para 1 M.

Para o tempo de extração de 5 minutos é possível observar uma diminuição na atividade de 58,93% com a mudança da concentração de bicarbonato de 0,1 M para 0,5 M e de 70,77% com a mudança da concentração de bicarbonato de 0,1 M para 1 M.

Para o tempo de extração de 10 minutos é possível observar uma diminuição na atividade de 56,76% com a mudança da concentração de bicarbonato de 0,1 M para 0,5 M e de 72,33% com a mudança da concentração de bicarbonato de 0,1 M para 1 M.

É possível notar o grande “gap” entre as atividades obtidas na utilização da concentração de bicarbonato de 0,1 M em relação as demais concentrações utilizadas. A partir desse fato podemos inferir, que foi a menor concentração de bicarbonato que proporcionou o melhor resultado

Observa-se que a diminuição na atividade se situa em torno de 60% na mudança da concentração de bicarbonato de 0,1 M para 0,5 M e de 70% na mudança da concentração de bicarbonato de 0,1 M para 1 M.

É importante ressaltar o expressivo impacto ao se decuplicar a concentração de bicarbonato na diminuição dos valores de atividade obtida, quando o contrário seria esperado. Mantendo-se a tendência da diminuição, podemos inferir que chegará um certo ponto onde não ocorrerá mais reação. Como o fator tempo atua a favor da atividade, percebe-se que esse ponto chegará antes para os menores tempo.

O fato de ocorrer a diminuição na atividade obtida e conseqüentemente na quantidade de enzima extraída, levanta duas possibilidades: A primeira é de que o aumento da concentração de bicarbonato está ocasionando a inibição da reação. Já a segunda é de que o aumento da concentração de bicarbonato está alterando os valores de pH da amostra, fator considerado crucial para o Método do Choque Osmótico.

Para constatar o que de fato está ocasionando a diminuição dos valores de atividade em detrimento do aumento da concentração de bicarbonato, seria necessário então, realizar novos experimentos monitorando e mantendo fixo os valores de pH. Dessa forma, pode ser definido através de exclusão, qual o fator causou interferiu no desempenho do Método do Choque Osmótico: Inibição ou variação do pH.

#### 5.4 Inversão da Sacarose em Glicose

Conhecendo-se a quantidade de mols de Sacarose adicionada as amostras e a quantidade após a ocorrência da reação, é possível estimar a inversão da sacarose em glicose proporcionada pela enzima invertase. Para efeito de ilustração, mostra-se a linha de cálculo para a amostra do Moinho de Bolinhas referente ao tempo de extração de um minuto e 1g de esferas de vidro.

Primeiramente, calcula-se o número de mols de sacarose adicionados a reação durante o processo de quantificação da glicose (item 4.4):

$$C_{sacarose\_inicial} = 10000 \mu\text{mol/L}$$

$$N_{sacarose\_inicial} = C_{sacarose\_inicial} \times V_{sacarose\_inicial}$$

$$N_{sacarose\_inicial} = 10000 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \times 0,007\text{L} = 70\mu\text{mol}$$

A seguir, calcula-se o número de mols de Sacarose após o processo de inversão. Este número é a quantidade de mols de Sacarose inicial menos a quantidade de mols que se inverteram em glicose, ou seja, mols de glicose formados. Para que o número de mols de glicose formados possa ser subtraído do número de mols de sacarose inicial, é importante lembrar de multiplica-lo pelo fator de conversão da sacarose 0,95:

$$N_{glicose\_formados} = C_{glicose} \times V_{reacional}$$

$$N_{glicose\_formados} = 1083,661 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \times 0,0026\text{L} = 2,82 \mu\text{mol}$$

$$N_{sacarose\_pós\_reação} = N_{sacarose\_inicial} - (0,95 * N_{glicose\_formados})$$

$$N_{sacarose\_pós\_reação} = 70 - (0,95 * 2,82) = 67,18 \mu\text{mol}$$

Por fim, efetua-se o cálculo da conversão de Sacarose:

$$\text{Inversão (\%)} = \frac{N_{sacarose\_inicial} - N_{sacarose\_pós\_reação}}{N_{sacarose\_inicial}}$$

$$\text{Inversão (\%)} = \frac{70 - 67,18}{70} \times 100 = 4,025\%$$

É importante ressaltar que a quantificação de glicose utilizada nesse cálculo foi obtida através de espectrofotometria de amostras diluídas em dez vezes, portanto:

$$\text{Inversão (\%)} = 4,025 \times 10 = 40,250\%$$

#### **5.4.1 Inversão da Sacarose em Glicose para os Diferentes tempos de Extração e Quantidade de Esferas**

A Tabela 7, apresenta os resultados obtidos para inversão da sacarose em glicose nos diferentes tempos de extração e quantidade de esferas de vidro:

**Tabela 7 - Inversão da Sacarose em glicose para o Método do Moinho de Bolas.**

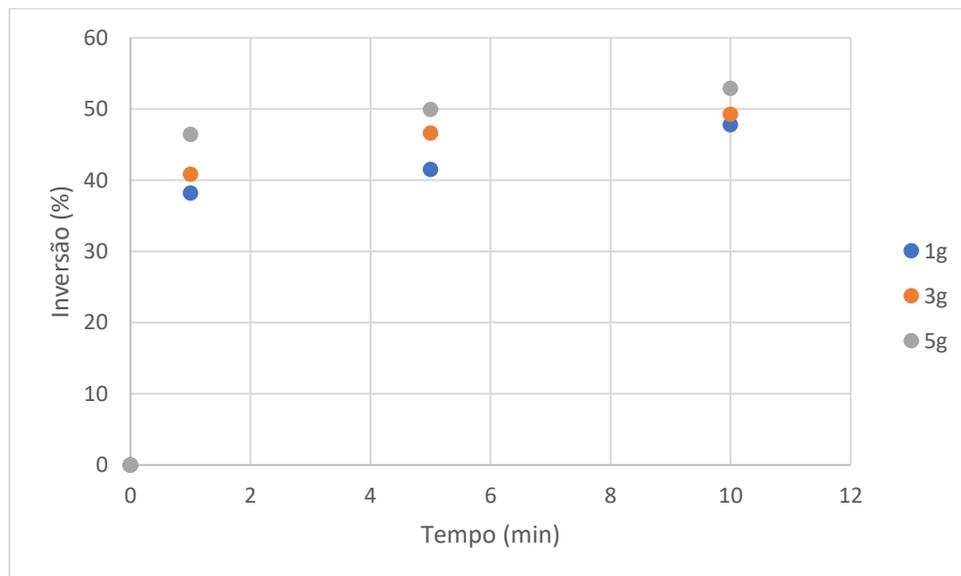
TEMPO (min)	INVERSÃO (%)		
	1g	3g	5g
1	38,238 ± 0,002	40,875 ± 0,006	46,479 ± 0,001
5	41,534 ± 0,004	46,643 ± 0,003	49,940 ± 0,001
10	47,797 ± 0,002	49,280 ± 0,001	52,907 ± 0,001

Fonte: Tabela construída pelo autor.

O menor valor atingido para a Inversão foi de 38,238% que se deu no tempo de 1 minuto e 1 g de esferas. Já o maior valor foi de 52,907% que se deu no tempo de 10 minutos e 5 g de esferas. A combinação que atinge o maior resultado, inclui o maior tempo de extração e a maior quantidade de esferas.

Os dados apresentados na Figura 13 mostram a relação entre a Inversão de sacarose em glicose com o tempo e quantidade de esferas de vidro utilizadas:

Figura 13 - Dados da Inversão de Sacarose pelo Tempo para o Moinho de Bolas.



Fonte: Do autor (2020).

Observando os dados da Figura 13, bem como da Tabela 7 é possível observar que assim como para a atividade, a Inversão aumenta com o aumento do tempo de extração e quantidades de esferas utilizadas.

### 5.4.2 Inversão da Sacarose em Glicose para os Diferentes tempos de Extração e Concentração de Bicarbonato

A Tabela 8, apresenta os resultados obtidos para atividade enzimática nos diferentes tempos de extração e concentrações de bicarbonato:

**Tabela 8 - Inversão da Sacarose em glicose para o Método do Choque Osmótico.**

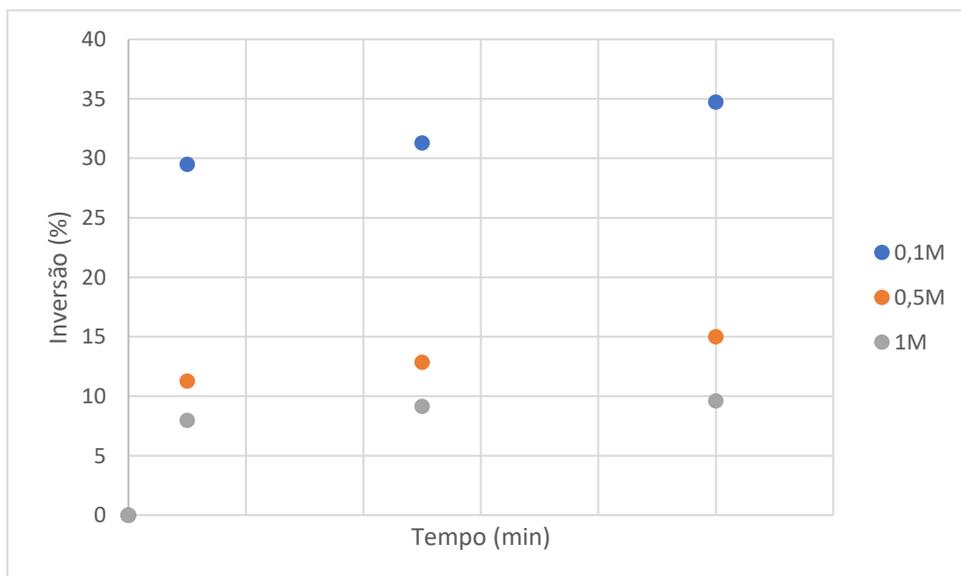
TEMPO (min)	INVERSÃO (%)		
	0,1M	0,5M	1M
1	29,502 ± 0,011	11,257 ± 0,009	7,961 ± 0,008
5	31,299 ± 0,013	12,856 ± 0,005	9,147 ± 0,001
10	34,727 ± 0,064	15,015 ± 0,048	9,609 ± 0,006

Fonte: Tabela construída pelo autor.

O menor valor atingido para a Inversão foi de 7,961% que se deu no tempo de 1 minuto e 1 M de bicarbonato. Já o maior valor foi de 34,727% que se deu no tempo de 10 minutos e 0,1 M de bicarbonato.

Os dados apresentados na Figura 14 mostram a relação entre a Inversão de sacarose em glicose com o tempo e as concentrações de bicarbonato utilizadas:

Figura 14 - Dados da Inversão de Sacarose pelo Tempo para o Choque Osmótico.



Fonte: Do autor (2020).

Observando os dados da Figura 14, bem como da Tabela 8 é possível observar que a Inversão aumenta com o aumento do tempo de extração para todas as concentrações de bicarbonato utilizadas. Apesar disso, observa-se a diminuição da Inversão com o aumento da concentração de bicarbonato. É notável que as maiores inversões ocorrem em 0,1 M de bicarbonato, já que sua curva se apresenta muito acima das demais.

## 5.5 Avaliação de viabilidade

Finalmente, de posse dos dados de absorvância, concentração de glicose, Atividade e inversão, pode-se avaliar a opção mais viável dentre os casos estudados.

No caso do Método de Moinho de Bolas é interessante notar o impacto da quantidade de esferas nos resultados obtidos em detrimento do tempo. Por exemplo, usando-se de 5 g de esferas em apenas 1 minuto de extração, atingiu-se um resultado superior ao tempo de 10 minutos quando usado apenas 1 g de esferas de vidro. Ou seja, com o auxílio da maior quantidade de esferas, é possível diminuir consideravelmente o tempo e os esforços empreendidos na extração.

Apesar dos valores máximos para concentração de glicose terem sido obtidos no tempo de 10 minutos e 5g de esferas, é preciso muita cautela ao avaliar a opção mais viável. Para isso, é necessário avaliar os gastos energéticos e financeiros para os aumentos do tempo e da quantidade de esferas, em detrimento da quantidade de enzima obtida.

Avaliando a quantidade de esferas como um investimento, e verificando que tal poderá ser recuperado ao longo dos anos, percebemos que perante as variações positivas para a enzima obtida com o um aumento de 5 vezes a quantidade de esferas, é preferível a utilização da quantidade de 5 g.

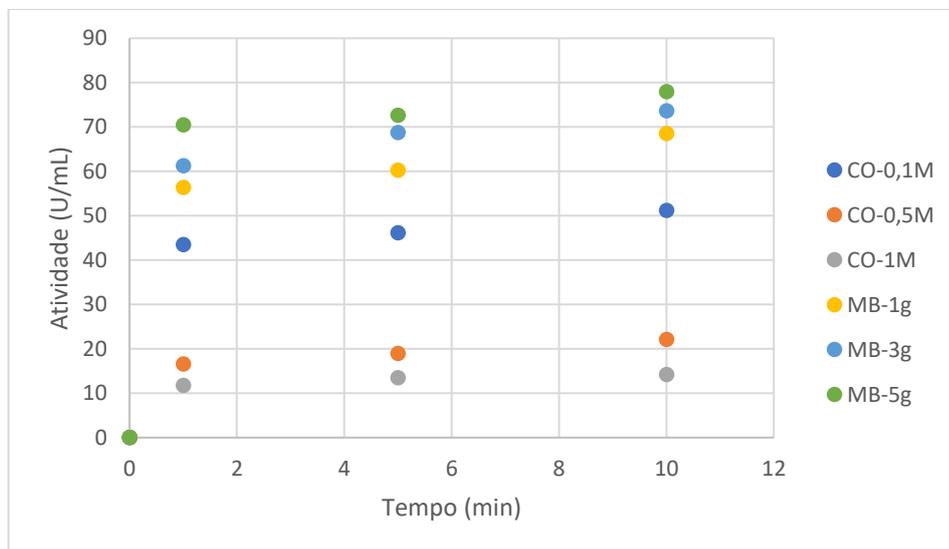
Já para o tempo, temos que o mesmo é um custo variável, pois dependerá de fatores como o custo da energia elétrica, força de trabalho necessária, além de ser um fator crucial para o deterioramento dos equipamentos. Portanto, para a quantidade de 5 g de esferas, observando a pequena variação na quantidade de enzima ao ser quintuplicado o tempo (cerca de 3%) e também ao aumenta-lo em 10 vezes (cerca de 10%), podemos inferir que a melhor opção e a utilização do tempo de 1 minuto.

Desse modo, a opção mais viável dentro das condições avaliadas para o Método do Moinho de Bolas é a combinação que inclui a maior quantidade de esferas de vidro (5 g) e o menor tempo (1minuto).

Em relação ao Método do Choque Osmótico, a partir da constatação de que o aumento da concentração de bicarbonato está teoricamente ocasionando a inibição da reação, podemos concluir que, entre as concentrações de bicarbonato estudadas, deve-se preferir a de 0,1 M combinada com o maior tempo (10 minutos) onde os resultados foram expressivamente melhores.

## 5.6 Comparação entre os Métodos: Choque Osmótico e Moinho de Bolas

Figura 15 - Gráfico Atividade Enzimática pelo Tempo. Comparação entre os Métodos do Moinho de Bolas (MB) e Choque Osmótico (CO).



Fonte: Do autor (2020).

Com o intuito de comparar a eficiência dos dois métodos estudados e identificar o mais viável, foi construído um gráfico como mostrado na Figura 15. Nela, apresenta-se uma comparação quanto aos valores obtidos para as atividades, segundo os métodos Moinho de Bolas e Choque Osmótico.

A partir da Figura 15 fica perceptível os resultados superiores obtidos pelo método do moinho de bolas, observando que as curvas de tal método se encontram muito acima das curvas relativas ao método do choque osmótico, mesmo para seu melhor resultado (0,1 M de bicarbonato). A partir disso, pode-se inferir que foi obtida mais enzima invertase nas amostras submetidas ao Método do Moinho de Bolas e que seu rompimento celular foi mais efetivo. É importante ressaltar que o Método Choque Osmótico foi prejudicado pela inibição ocasionada pelo bicarbonato.

Os valores obtidos para a atividade no Método do Moinho de bolas variam entre 56 e 77 U/mL aproximadamente, enquanto que para o método do Choque Osmótico, os valores de atividade variam entre 11 e 51 U/mL aproximadamente. Sendo assim, o maior resultado obtido para o método do Choque Osmótico, ainda é inferior ao menor resultado obtido para o Método do Moinho de Bolas, sendo que estes divergem em 9,80%.

Quanto maior o valor da atividade, maior o valor da velocidade de reação. Visto isso, é interessante notar que, a velocidade de reação para o Método do moinho de Bolas é maior que a velocidade para o outro método. Como a enzima é um catalisador, isso indica uma maior concentração dela nas amostras submetidas ao Método do Moinho, fato que se dá pelo rompimento mais efetivo que o mesmo proporciona.

A diferença constatada para o maior valor obtido para atividade no Método do Moinho de Bolas (77,967) e no Método do Choque Osmótico (51,177) é de 52,35%.

As combinações mais viáveis apontadas para cada método, como já mencionado anteriormente em outros tópicos, foram 5 g de esferas e 1 minuto para o Método do Moinho de Bolas e 0,1 M de bicarbonato e 10 minutos para o Método do Choque Osmótico. A combinação mais viável para o Moinho rendeu uma atividade de 70,438 U/mL, enquanto que a combinação mais viável (e também que proporcionou o maior resultado) para o Choque rendeu uma atividade de 51,177 U/ml. Realizando uma comparação entre os valores mais viáveis apontados para cada método, chega-se a uma diferença de 37,64%. Essa diferença evidencia mais uma vez a superioridade do Moinho de Bolas no rompimento celular

## **6 CONCLUSÃO**

Como já abordado nesse trabalho, a hidrólise ou inversão da sacarose em glicose ocorre com o auxílio da enzima invertase. Desse modo, o aumento da concentração da glicose (e consequentemente aumento na atividade) significa um aumento da concentração da enzima invertase. Portanto, é interessante notar que os resultados que apresentam altos valores de atividade, também apresentam altos valores de Inversão. Porém, um fator muito importante a ser observado é o tempo, visto que o aumento na obtenção da Invertase deve justificar o aumento no tempo de extração. Além disso, a concentração de bicarbonato no caso do Choque Osmótico e a quantidade de esferas de vidro no caso do Moinho de Bolas são fatores preponderantes na escolha das opções mais viáveis.

É importante ressaltar que nenhuma das curvas, em nenhum dos métodos utilizados, atingiu a estabilidade, porém analisando os aumentos na porcentagem de concentração de glicose e atividade pelos intervalos de tempo, é possível inferir até quando o processo é vantajoso, levando em conta o trabalho e o tempo empreendidos.

Para o Método do Moinho de Bolas foi observado que absorvância, e conseqüentemente concentração de glicose e atividade aumentaram tanto com o tempo como com a quantidade de esferas de vidro. Nesse caso, a opção mais viável dentre as condições avaliadas é a combinação que inclui a maior quantidade de esferas de vidro (5 g) e o menor tempo (1 minuto). Isso se dá pelo fato de que o aumento de enzima obtida após o tempo de 1 minuto, não justificam o esforço empreendido a mais. Em relação as esferas de vidro, a maior quantidade apresentou resultados expressivamente superiores, sendo assim justificada a sua escolha como opção mais viável.

Para o método do Choque Osmótico observa-se que a absorvância, concentração de glicose e atividade estão aumentando com o tempo e diminuindo com a concentração de bicarbonato. A opção mais viável nesse caso é a concentração de 0,1M de bicarbonato combinada com o maior tempo (10 minutos) onde os resultados foram expressivamente melhores.

É importante ressaltar que a diminuição da quantidade de enzima obtida com o aumento da concentração de bicarbonato pode estar relacionada tanto com variações no pH quanto a uma possível enzimática. É necessária a realização de mais experimentos com pH fixado para se obter uma conclusão do que de fato está interferindo no desempenho do Método do Choque Osmótico.

A superioridade do Moinho de Bolas pode ser explicada por se tratar de um método mecânico, enquanto que o Choque Osmótico se trata de um método físico-químico. Dessa forma o Moinho de Bolas proporciona uma maior abrasão e conseqüentemente um maior rompimento celular. Outro fator que pode ter prejudicado o desempenho do método de Choque Osmótico é a temperatura ótima da enzima invertase, que se encontra entre 35 °C a 40 °C, impossibilitando assim aumentos muito expressivos de temperatura que podem levar à desnaturação das enzimas e comprometer os resultados.

Em suma, pode-se afirmar que os experimentos foram válidos para melhor interpretação dos métodos de rompimento celular: Moinho de Bolas e Choque Osmótico e as implicações de suas variáveis na obtenção da enzima invertase.

## 7 SUGESTÕES

- a) Realizar o experimento com outros métodos de rompimento como por exemplo ultrassom.
- b) Realizar o experimento do Choque Osmótico com concentrações de bicarbonato inferiores a 0,1 M para identificar a concentração ótima e o ponto onde se inicia a inibição.
- c) Utilizar MEV-Microscopia Eletrônica de Varredura para analisar a configuração das células após o rompimento.
- d) Utilizar Cromatografia Líquida de alta eficiência para realizar a quantificação da glicose com mais precisão.
- e) Refazer os experimentos para o Método do Choque Osmótico fixando o pH das amostras afim de investigar o fator interferente no desempenho do método: inibição ou variação de pH.

## 8 REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

CARVALHO, B.M.; BENTO, C.V.; SILVA, J.B.A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais No Processo Cervejeiro: 1º Parte – As Leveduras. Artigo Universidade de São Paulo. Departamento de Biotecnologia 2006.

COELHO, Pedro. *Saccharomyces cerevisiae*. **EngQuímica Santos SP**, 19 de setembro de 2013. Disponível em: <<https://www.engquimicasantosp.com.br/2013/09/saccharomyces-cerevisiae.html>>. Acesso em: 10 de setembro de 2019.

CONTIERO, Jonas, et al. Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces fragilis*. 1992.

DIAS, Emanuele Cardoso et al. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DA ENZIMA INVERTASE A PARTIR DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS NÃO CONVENCIONAIS. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 352-369, 2018.

FERRACINI-SANTOS, Luciana et al. Isolamento de polímeros da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da atividade antioxidante da manana-proteína isolada. **Química Nova**, 2009.

FLEURI, Luciana Francisco; SATO, Hélio Harumi. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FOGAÇA, Jennifer Rocha Vargas. Açúcar invertido: Composição e aplicação do açúcar invertido. **Alunos Online**, 08 de maio de 2013. Disponível em: <<https://alunosonline.uol.com.br/quimica/acucar-invertido.html>>. Acesso em: 17 de março de 2020.

JUNIOR, ANTONIO MARSAIOLI; ARÉVALO, ZILDA DORATIOTTO DE SALLES. ESTUDO DA TERMÓLISE DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* DE USINA DE ÁLCOOL USANDO ENERGIA DE MICROONDAS. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 2001, 19.1.

MACHADO JUNIOR, Francisco Roberto da Silva. Ruptura celular, extração e encapsulamento de Astaxantina de *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta). 2014.

MARINELLO, Monichara. Rompimento Celular, notas de estudo de Biotecnologia. **Docsity**, 15 de março de 2013. Disponível em: <<https://www.docsity.com/pt/rompimento-celular-1/4716075/>>. Acesso em 10 de setembro de 2019.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo Baptista. Bioquímica básica. 1999.

MEDEIROS, Fabiana Oliveira de et al. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de beta-galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959

MONKS, Luciana Maroñas. **Métodos químicos, físicos e enzimáticos utilizados na ruptura celular de *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**. 2012. Tese de mestrado. URI – CAMPUS ERECHIM, Rio Grande do Sul.

MONTEIRO, Valdirene Neves; DO NASCIMENTO SILVA, Roberto. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista processos químicos*, 2009, 3.5: 9-23.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica: Lehninger**. Omega, 2014.

NOVAKI, Lexandra et al. Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus casei* ellus. 2009.

NOVAKI, Lexandra, et al. Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. *Engevista*, 2010, 12.2.

OLIVEIRA, Alexandre Maniçoba et al. Estudo da radiação de micro ondas na redução da concentração de *Saccharomyces cerevisiae* para a busca de uma nova radioterapia de endocardites bacterianas. **Exatas Online**, v.9, p. 1-7, 2018.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti, et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 2012, 7.3.

PINHEIRO, Denise Maria; DE ANDRADE PORTO, Karla Rejane; DA SILVA MENEZES, Maria Emília. **A Química dos Alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e**. Editora Edufal. Maceio, Alagoas, 2005.

POÇAS, Evandro Cesar et al. Aplicação de bucha vegetal (*Luffa Cylindrica*) como suporte para produção de xarope de açúcar invertido. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 53-58, 2004.

PODADERA, Priscilla. **Estudo das propriedades do açúcar líquido invertido processado com radiação gama e feixe de elétrons**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

QUINES, Luci KM et al. Métodos de extração de poli-hidroxicarboxilatos a partir de biomassa bacteriana. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1207-1218, 2015.

SANTIN, Ana Paula et al. Estudo da secagem e da inativação de leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*. 1996.

SCHMIDELL, Willibaldo et al. **Biotecnologia industrial-vol. 2: engenharia bioquímica**. Editora Blucher, 2001.

SILVA, Vanessa Karla. Extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e prebiótico na dieta pré-inicial para frangos de corte criados em diferentes temperaturas. 2007.

SILVA, Janiciara Botelho; RODRIGUES, José Augusto Jorge; NONO, Maria do Carmo de Andrade. Caracterização de materiais catalíticos. **Qualificação de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE)**, 2008.

SILVA, Juliana Aliques de Oliveira. Modelagem do moinho de bolas de rocha fosfática da empresa anglo american fosfatos Brasil utilizando a ferramenta Moly-Cop Tools. **Especialização em tratamento de minérios (UFG)**, 2014.

Características, morfologia e ciclo de vida da *Saccharomyces cerevisiae*. **Thpanorama**. Disponível em: <<https://pt.thpanorama.com/blog/ciencia/saccharomyces-cerevisiae-caracteristicas-morfologia-v-ciclo-de-vida.html>>. 2015. Acesso em: 10 de setembro de 2019.

Zenki, K.C. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014. 15 p.