



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIA - CTG
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA - DEQ

FLÁVIO ESDRAS COLARES RODRIGUES DA SILVA

ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE INVERTASE DE *Saccharomyces cerevisiae*

RECIFE

2024

FLÁVIO ESDRAS COLARES RODRIGUES DA SILVA

ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE INVERTASE DE *Saccharomyces cerevisiae*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Química Industrial da
Universidade Federal de
Pernambuco, Centro Acadêmico
de Recife, como requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho

RECIFE

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Flávio Esdras Colares Rodrigues da.

Estudo da extração de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* / Flávio Esdras Colares Rodrigues da Silva. - Recife, 2024.

31p

Orientador(a): Pedro Ferreira de Souza Filho

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Química Industrial - Bacharelado, 2024.

1. Extração. 2. Invertase. 3. Precipitação Termica. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Filho, Pedro Ferreira de Souza. (Orientação). II. Título.

540 CDD (22.ed.)

Flávio Esdras Colares Rodrigues da Silva

ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE INVERTASE DE *Saccharomyces cerevisiae*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Química Industrial
da Universidade Federal de Pernambuco,
Centro Acadêmico de Recife, como requisito
para a obtenção do título de Bacharel em
Química Industrial.

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr^a. Sara Horacio de Oliveira Maciel (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Gisely Alves da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A meu Orientador Professor Pedro Ferreira de Souza Filho, por sua orientação valiosa, apoio e conhecimentos profundos que enriqueceram este trabalho.

Ao Corpo docente e técnicos do laboratório de Microbiologia: Ivys Antônio, Gisely Alves, Daniel Renan, Conceição, Professoras Maria de Los Angeles Perez, Glória Maria Vinhas e Sara Horácio.

À Universidade Federal de Pernambuco, por fornecer os recursos, instalações e oportunidades de pesquisa que possibilitaram este estudo.

Agradeço a minha família e amigos por seu apoio emocional, compreensão e incentivo ao longo deste processo.

Agradeço a todos que auxiliaram na pesquisa bibliográfica e na obtenção de materiais necessários para a elaboração deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para este projeto, o meu mais profundo agradecimento.

Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental na realização deste trabalho científico. Agradeço do fundo do meu coração por sua generosidade, orientação e apoio contínuo.

Muito obrigado!

RESUMO

A invertase é uma enzima importante tanto no aspecto industrial, para a área alimentícia, evitando a cristalização do açúcar, quanto no metabolismo de diversos organismos, sendo responsável pela hidrólise da sacarose em frutose e glicose. Este último açúcar representa o principal combustível para a produção de energia em organismos, gerando ATP e NADH. A invertase pode ser localizada principalmente em três estruturas: no citoplasma, nos vacúolos e na parede celular, sendo esta última a mais extraída em laboratórios pelo método de extração química utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O presente trabalho teve por objetivo analisar o efeito do tempo de contato da solução de extração com a levedura liofilizada sobre a recuperação da invertase. A levedura *S. cerevisiae* comercial liofilizada foi colocada em contato com uma solução de extração, bicarbonato de sódio 0,1 M por diferentes intervalos de tempo (entre 0,5 h e 29,5 h), sendo centrifugadas ao final para separação do sólido e do líquido (lisado). Cada uma dessas amostras foi submetida a testes analíticos, a fim de observar a cinética da extração, podendo assim identificar possíveis etapas ocorridas ao longo do procedimento. Foi constatada, a partir da análise de açúcares redutores, uma atividade enzimática semelhante ao longo de todo intervalo de tempo, indicativo da rápida liberação da enzima presente associada à membrana da célula. Entretanto, o meio se encontrava com alto teor de impurezas, o que resultava em interferências nas análises. Essa situação foi superada deixando o lisado na estufa a 45 °C por período superior a 5 h, representando assim uma fase de purificação da invertase, etapa fundamental para a utilização da enzima, visto que a presença de tais impurezas no meio impossibilita a correta determinação da atividade enzimática. Este trabalho destacou o valor do desenvolvimento contínuo de todo o conhecimento adquirido ao longo do curso, como também reforçou a importância das experiências anteriores para a compreensão e resolução de problemas futuros.

Palavras-chave: Extração. Invertase. Precipitação térmica. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Invertase is an important enzyme both in the industrial aspect, for the food industry by preventing sugar crystallization, and in the metabolism of various organisms, being responsible for the hydrolysis of sucrose into fructose and glucose. The latter sugar represents the main fuel for energy production in organisms, generating ATP and NADH. Invertase can be primarily located in three structures: in the cytoplasm, in vacuoles, and in the cell wall, with the latter being the most extracted in laboratories through the chemical extraction method using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The present work aimed to analyze the effect of the extraction solution's contact time with the lyophilized yeast on the recovery of invertase. The commercial lyophilized *S. cerevisiae* yeast was placed in contact with a 0.1 M sodium bicarbonate extraction solution for different time intervals (between 0.5 h and 29.5 h) and centrifuged at the end to separate the solid and liquid (lysate) phases. Each of these samples was subjected to analytical tests to observe the extraction kinetics, thus identifying possible stages occurring throughout the procedure. It was found, through the analysis of reducing sugars, that enzymatic activity remained similar throughout the entire time interval, indicating the rapid release of the enzyme associated with the cell membrane. However, the medium contained a high level of impurities, resulting in interference in the analyses. This situation was overcome by placing the lysate in an oven at 45 °C for more than 5 hours, representing a purification phase of invertase, a crucial step for the enzyme's use, since the presence of such impurities in the medium prevents the correct determination of enzymatic activity. This work highlighted the value of continuously developing the knowledge acquired throughout the course, as well as reinforcing the importance of previous experiences for the understanding and resolution of future problems.

Keywords: Extraction. Invertase. *Saccharomyces cerevisiae*. Thermal precipitation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1	Reação do ácido 3,5-dinitrossalicílico com açúcar redutor genérico	13
Figura 2	Fermento utilizado	17
Figura 3	Levedura em contato com a solução de NaHCO ₃ na estufa	17
Figura 4	Amostra após 29,5 h na estufa a 45 °C	18
Figura 5	Armazenamento das Amostras	18
Figura 6	Lama resultante da centrifugação da amostra 12 (tempo 8 h)	22
Figura 7	Comparativo de turbidez, amostras 1, 5, 10, 13 e 14, da esquerda para a direita antes da precipitação térmica	25
Figura 8	Superfície de resposta para efeito interativo de NaHCO ₃ (X ₁) e da velocidade de agitação (X ₂) no processo de extração de invertase (ILD) obtida por autólise de <i>S. cerevisiae</i> de purê de pêssego (ISc) da cv. Jubileu. a AR de 100% a 25°C e pH 5 igual a 14,7 U/mg	27

GRÁFICOS

Gráfico 1	Volume de lisado obtido por tempo de contato da levedura com a solução de extração	21
Gráfico 2	Concentração de açúcares redutores no lisado antes da precipitação térmica	22
Gráfico 3	Concentração de açúcares redutores no lisado após a precipitação térmica	23
Gráfico 4	Comparativo do efeito da precipitação térmica sobre a quantidade de açúcares no tempo zero	24
Gráfico 5	Concentrações de açúcares redutores no tempo zero e após 10 minutos de contato com a solução enzimática	26
Gráfico 6	Atividade enzimática de invertase nas amostras	26
Gráfico 7	Concentração de sólidos (mg/mL) no lisado em função do tempo de extração	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADNS	Ácido dinitrosalicílico
------	-------------------------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	OBJETIVO GERAL	11
1.1.1	Objetivos específicos	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
2.2	MÉTODO EXTRAÇÃO QUÍMICA	12
2.3	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	13
2.4	ENZIMAS	14
2.5	PRECIPITAÇÃO TÉRMICA	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	EXTRAÇÃO DA ENZIMA PELO MÉTODO QUÍMICO	16
3.2	TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	18
3.3	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES E ATIVIDADE ENZIMÁTICA	19
3.4	REMOÇÃO DE PROTEÍNAS POR PRECIPITAÇÃO TÉRMICA	19
3.5	PESO SECO	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
4.1	EXTRAÇÃO DA INVERTASE	21
4.2	ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO LISADO	22
4.3	PESO SECO	27
5	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

Biotecnologia, segundo A *Convenção sobre Diversidade Biológica* (ONU, 2024), se define como uma aplicação tecnológica que se utiliza de sistemas biológicos para a síntese, ou transformação de várias substâncias de interesse econômico. Por este motivo, ela se tornou uma área utilizada em diversas indústrias, incluindo a farmacêutica, alimentícia, agrícola e de energia, podendo ser produzidas extracelular como etanol e de forma intracelular como algumas enzimas. A extração de substâncias intracelulares envolve a ruptura das células para liberar o conteúdo desejado. Isso pode ser realizado por métodos físicos, como sonicação ou moagem, ou métodos químicos, como uso de detergentes ou enzimas. Após a ruptura celular, a mistura resultante é submetida a processos de separação e purificação, como centrifugação e filtração, para isolar a substância intracelular específica.

A invertase é uma enzima de grande interesse econômico, especialmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Ela catalisa a hidrólise da sacarose em glicose e frutose, um processo essencial na produção de diversos produtos. A invertase é amplamente utilizada na fabricação de doces, xaropes e outros produtos que requerem um alto teor de açúcar invertido, o qual apresenta maior solubilidade e menor tendência à cristalização. A produção de invertase geralmente se dá através da fermentação em estado sólido utilizando leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*. Após a fermentação, a enzima precisa ser extraída, o que é feito frequentemente por autólise, onde as células são rompidas para liberar a enzima. Apesar de serem uma substância orgânica, tipo proteína, as enzimas mantêm pleno funcionamento de suas atividades biológicas mesmo após serem removidas das células (Eduard, [s.d.]). Para a extração de enzima e proteínas se faz necessário uma sequência de procedimentos a fim de obter o maior grau e pureza possível.

Nestes casos a molécula alvo corresponde, no geral, a aproximadamente 0,1% da concentração de sólidos no meio, sendo necessário atingir um grau de pureza de aproximadamente 98%. Estando localizada no interior das células, ou na parede celular como no caso da invertase, é necessário inicialmente causar o rompimento das células, a lise celular. Uma vez extraída, se faz necessária a estabilização da proteína, pois estando fora do seu ambiente natural ela fica exposta a influência de inúmeros agentes que podem danificá-la, fazendo assim que perca a sua função. Utiliza-se de diversos procedimentos para a purificação, desde técnicas mais simples, como adição de sais à solução, modificando assim a solubilidade da proteína, a procedimentos cromatográficos. A escolha do método varia dependendo das características da molécula alvo, suas propriedades e da solução onde ela se

encontra, pois caso haja a lise celular, se faz necessária a retirada dos fragmentos celulares residuais na solução (Voet; Voet; Pratt, 2013).

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tempo de contato na técnica de extração química da invertase.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Extrair a enzima invertase da célula da levedura
- Avaliar o efeito do tempo de contato entre a levedura liofilizada e a solução de extração sobre a solubilização da invertase;
- Analisar a remoção de impurezas do lisado por precipitação térmica a 45 °C.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é uma espécie de levedura, um fungo unicelular. Domesticada há milhares de anos, é o organismo conhecido por produzir uma variedade de bebidas alcoólicas, como cervejas e vinhos, e produtos assados, como pães. Embora os cervejeiros e padeiros não soubessem exatamente como *S. cerevisiae* era capaz de produzir esses produtos, os cientistas estudaram extensivamente esse organismo desde o início do século XIX em um esforço para entender melhor seus processos. Agora se sabe que *S. cerevisiae* contribui para a produção de álcool e produtos assados passando por um processo bioquímico conhecido como fermentação. A fermentação por levedura se tornou um dos primeiros processos a serem investigados na disciplina de bioquímica.

O estudo de *S. cerevisiae* não se limitou à produção de cerveja e panificação. Como organismos unicelulares, *S. cerevisiae* se reproduz muito rapidamente, em taxas comparáveis às células bacterianas em condições de boa a ótima. Como eucariotos, eles contêm vários dos mesmos sistemas celulares de organismos multicelulares, incluindo paredes celulares, membranas celulares, núcleos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, mitocôndrias, vacúolos e vesículas. Ao combinar esses aspectos, *S. cerevisiae* serve como um excelente organismo modelo que pode ser facilmente cultivado e manipulado em laboratório para estudar mecanismos e processos que aprimoram nossa compreensão de conceitos maiores em biologia (Cotoia, 2020).

2.2 EXTRAÇÃO DE PRODUTOS INTRACELULARES

Os produtos obtidos utilizando-se de micro-organismo podem ser apresentados de duas formas, extracelulares, quando são produzidos fora das células ou excretados, e intracelulares quando se mantêm retidas no interior da célula. Para que se possa obter os produtos intracelulares, é necessário romper a membrana celular, sendo isso possível por meios físicos, aplicando pressão para causar cisalhamento da estrutura, como na homogeneização de alta pressão, por exemplo, ou por métodos químicos modificando o meio, utilizando-se de princípio da osmose causando ruptura, adicionando solventes para dissolver ou enzimas para degradar. Em um meio salino ocorre um processo de fermentação em estado sólido da levedura. Este processo, também conhecido como autólise, envolve a ruptura da parede celular por osmose e a subsequente liberação da invertase externa, que se localiza na parede celular da levedura ou entre essa e a membrana citoplasmática. Em contrapartida, a invertase interna, que se encontra nos vacúolos, é de difícil acesso (Mannazzu *et al.*, 1998).

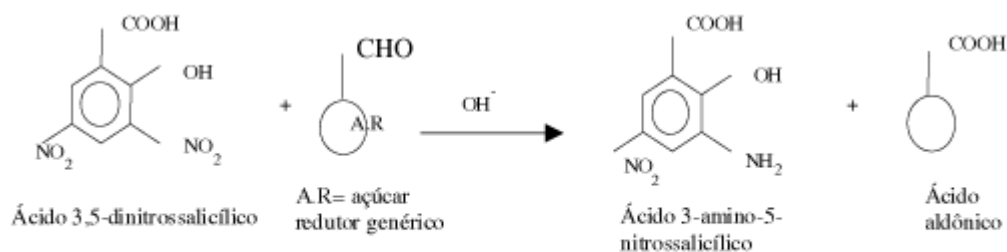
Neste processo, diversos fatores são importantes e interferem na eficiência da extração, que é medida pela atividade enzimática em termos de comprimento de onda absorvidos. Entre os vários fatores, destacam-se a influência da temperatura, da agitação, da pressão osmótica, do agente lisante e da concentração de substrato, entre outros (Vitolo, 1979; Illanes; Gorgollón, 1986).

Além disso, é importante ressaltar que a otimização desses fatores é crucial para maximizar a eficiência da extração. Por exemplo, temperaturas muito altas ou muito baixas podem inativar a enzima ou alterar sua estrutura, reduzindo sua atividade. Da mesma forma, uma agitação inadequada pode não permitir a completa ruptura da parede celular, enquanto uma pressão osmótica muito alta pode causar danos às células. Portanto, é essencial ajustar cuidadosamente esses parâmetros para garantir a máxima eficiência de extração.

2.3 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A técnica de análise de açúcares redutores se baseia no fato que os monossacarídeos, glicose e frutose, por possuírem grupo carbonílico e cetônico livres, sofrem oxidação na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. Os dissacarídeos que não possuem essa característica, sem sofrerem hidrólise da ligação glicosídica, são denominados de açúcares não redutores. O Ácido 3,5-dinitrossalicílico é reduzido para ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, como demonstrado na Figura 1, enquanto que, no caso mais simples, o grupamento aldeído parece ser oxidado a ácido aldônico (Miller, 1959).

Figura 1: Reação do ácido 3,5-dinitrossalicílico com açúcar redutor genérico



Fonte: Silva, 2003

2.4 ENZIMAS

Enzimas são compostos orgânicos dentro do grupo das proteínas, ou seja, elas têm os α -aminoácidos como subunidades estruturais básicas, os quais possuem um grupo amino e o radical R ligados ao primeiro átomo de carbono (α), em relação ao grupo ácido carboxílico. As enzimas têm atividade intra ou extracelular e desempenham funções catalisadoras, acelerando reações químicas que, sem a sua presença, dificilmente aconteceriam (Magalhães, [s.d.]).

A velocidade da reação catalisada por uma enzima é aumentada devido ao abaixamento da energia de ativação necessária para converter o substrato em produto. Esse aceleração pode ser da ordem dos milhões de vezes. Por exemplo, a enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilase diminui o tempo da reação por ela catalisada de 78 milhões de anos para 25 milissegundos (Radzicka; Wolfenden, 1995).

Sendo estruturas terciárias ou quaternárias, enzimas são dotadas de dobramentos tridimensionais em suas cadeias polipeptídicas, para sua atuação é necessário que o substrato se encaixe na enzima, um mecanismo de ação denominado como modelo chave-fechadura, com essa elevada especificidade como foi sugerido por Emil Fischer, em 1894, que esse fato era devido a que tanto as enzimas como os substratos apresentam formas geométricas complementares, fazendo com que encaixem de maneira precisa umas nos outros. A perda das estruturas secundária e terciária da proteína ou rompimento de ligações peptídicas é denominada desnaturação da proteína. São fatores que provocam a desnaturação: calor, radiações eletromagnéticas de certos comprimentos de onda (como as emitidas em um microondas ou os raios ultravioletas do Sol), ácidos e bases, solventes orgânicos, íons de metais pesados (Eduard, [s.d.]).

Invertase (nome sistemático: beta-frutofuranosidase) é uma enzima (sacarase). Ela catalisa a hidrólise da sacarose em frutose mais glicose, geralmente na forma de xarope de açúcar invertido. Para o uso industrial, a invertase é comumente obtida de leveduras, neste caso da *Saccharomyces cerevisiae*. (Invertase, 2020).

2.5 PRECIPITAÇÃO TÉRMICA

Proteínas tem uma estrutura bem definida, seja ela bidimensional tridimensional ou de estrutura quaternária. Entretanto essas estruturas são relativamente sensíveis a ação térmica quando a proteína em solução é aquecida ocorre o fenômeno de desnaturação ocorre o desdobramento de qualquer parte da estrutura que desestabiliza todo o resto colapsando assim

para uma estrutura aleatória, essa desnaturação acarreta em mudanças nas propriedades e características diminuindo assim a solubilidade da proteína (Voet; Voet; Pratt, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXTRAÇÃO DA ENZIMA PELO MÉTODO QUÍMICO

A enzima foi extraída por um processo de autólise em uma solução de bicarbonato de sódio 0,1 M. Em três Erlenmeyers de 500 mL, foram adicionados um total de 250 g de levedura *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada (FermiPan), Figura 2, e 750 mL da solução de NaHCO_3 , distribuídos de forma a manter a proporção de 1 g de levedura para 3 ml de solução. Foram distribuídos 25 ml da mistura em tubos de ensaio de 50 ml deixada em repouso em estufa a 45 °C (Figuras 3 e 4) por um determinado tempo seguindo a Tabela 1, em seguida a mistura foi centrifugada a 4000 RPM por 5 minutos, separando o sobrenadante com a enzima extraída e o precipitado contendo resíduos celulares, então armazenadas sobre refrigeração, Figura 5 (Torallés *et al.*, 2014).

Tabela 1: Identificação das amostras de acordo com o tempo de contato da levedura com a solução de bicarbonato de sódio.

Número	Tempo (h)
1	0,5
2	1,0
3	1,5
4	2,0
5	2,5
6	3,0
7	3,5
8	4,0
9	5,0
10	6,0
11	7,0
12	8,0
13	9,0
14	29,5

Fonte, Autor, 2024

Figura 2: Fermento utilizado



Fonte: Autor, 2024

Figura 3: Levedura em contato com a solução de NaHCO_3 na estufa.



Fonte: Autor, 2024

Paralelamente, outro tubo de ensaio foi preparado da mesma maneira, com 9 mL de sacarose 1 g/L e 1 mL do extrato enzimático. Entretanto, este tubo seguiu direto para o banho de gelo de modo que a inversão da sacarose não ocorresse. O conteúdo de ambos os tubos foi usado para determinar os açúcares redutores presentes no tempo zero, isto é, aqueles que já estavam presentes na amostra antes da ação da enzima, e após a reação.

3.3 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Em um tubo de Follin-Wu, foi adicionado 1 mL da solução de Ácido 3,5-dinitrosalicílico, com cuidado para inserir a pipeta o máximo possível, a fim de evitar que parte do material ficasse nas laterais da vidraria. Então, 0,5 mL da amostra foi adicionada e levada para o banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Após o tempo reacional, o sistema foi colocado em banho de gelo. Após esfriar, adicionou-se água destilada até a marca de 12,5 mL. A mistura foi homogeneizada antes da realização da leitura de absorbância no espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de açúcares redutores foi determinada através de uma curva padrão preparada previamente, que relaciona as medidas de absorbância e a concentração (Silva, 2003).

A concentração de atividade enzimática, segundo a Equação 1, foi determinada como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 µmol de açúcar redutor em 1 minuto (Amaya-Delgado; Hidalgo-Lara; Montes-Horcasitas, 2006).

$$Atividade = \frac{\Delta conc \text{ Açúcar}(\mu mol/mL) \times Volume \text{ Total}(mL)}{Tempo \text{ (min)} \times Volume \text{ Amostra}(mL)} \quad (1)$$

3.4 REMOÇÃO DE PROTEÍNAS POR PRECIPITAÇÃO TÉRMICA

O extrato enzimático, já centrifugado em um tubo Falcon, foi deixado em repouso na estufa a 45 °C por 24 h para a precipitação das proteínas mais termossensíveis. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 4000 RPM por 5 min e refrigerados na geladeira. O sobrenadante foi analisado em termos de atividade de invertase e a concentração de proteínas totais (Silva, 2024).

3.5 PESO SECO

O lisado enzimático, após a precipitação térmica, em um béquer previamente pesado, foi adicionado 1 ml do lisado e colocado na estufa a 100 °C por 24 h. Depois o béquer foi

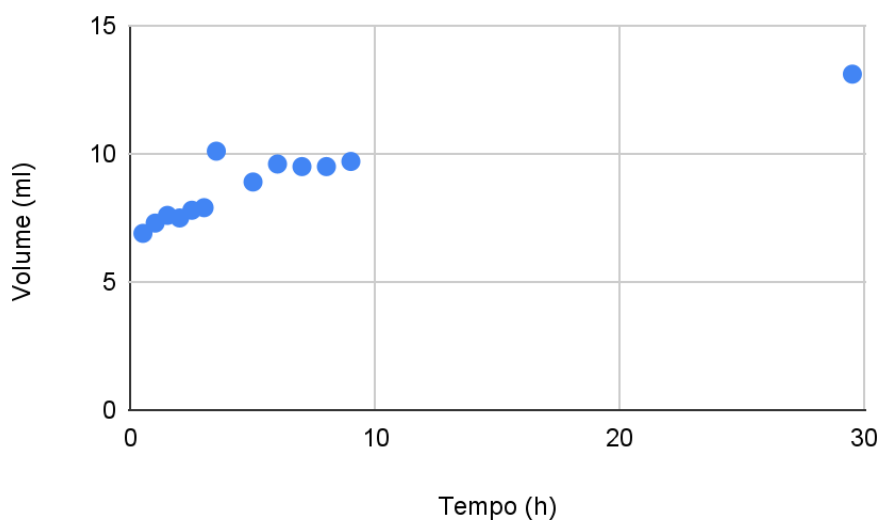
novamente pesado, a concentração de sólidos foi obtida com a diferença entre as massas (Miranda, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. EXTRAÇÃO DA INVERTASE

Após a centrifugação das amostras, foi mensurado o volume obtido, cujos valores estão apresentados no Gráfico 1. É notável um aumento gradual no volume relacionado diretamente ao tempo da extração. Isso se deve à degradação gradual das leveduras, o que pode explicar por que no início da extração o volume de lisado obtido foi baixo. Como a maior parte das células ainda não teriam sido completamente rompidas, a solução ainda estaria armazenada no interior delas. À medida que o tempo avança, observou-se uma mudança gradual na aparência do precipitado, visto que no início a lama da centrifugação apresentou aparência mais sólida (Figura 6) e, com o passar do tempo, adquiriu um aspecto mais pastoso.

Gráfico 1: Volume de lisado obtido por tempo de contato da levedura com a solução de extração



Fonte: Autor, 2024

Figura 6: Lama resultante da centrifugação da amostra 12 (tempo 8 h)

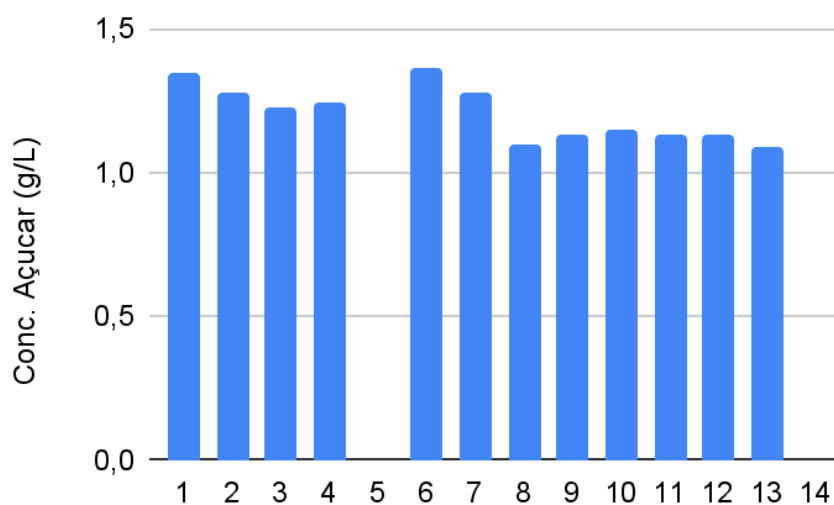


Fonte: Autor, 2024

4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO LISADO

A concentração de açúcares redutores nas amostras foi relativamente elevada, com uma média de 1,28 g/l, para todas as amostras, e com uma leve tendência negativa em relação ao tempo. Os valores obtidos foram semelhantes aos de um lisado semelhante analisado anteriormente (Silva, 2024).

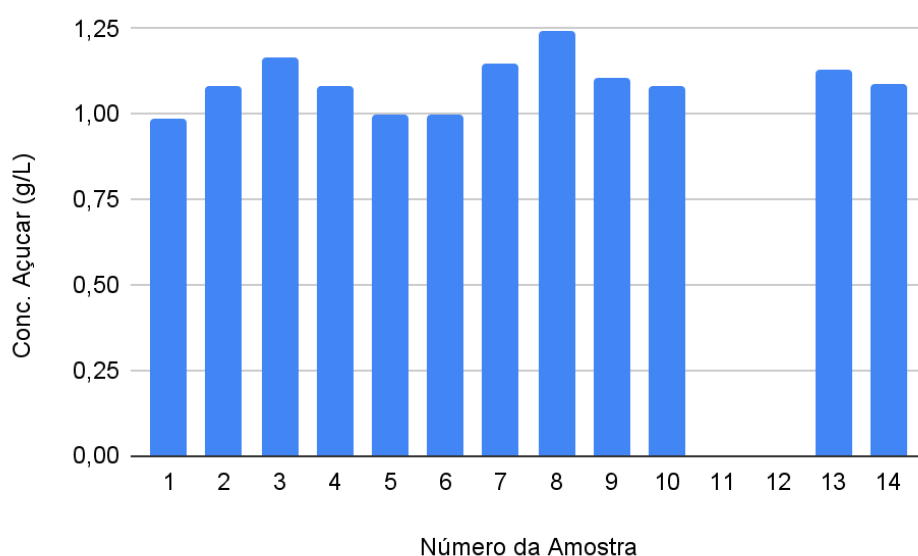
Gráfico 2: Concentração de açúcares redutores no lisado antes da precipitação térmica



Fonte: Autor, 2024

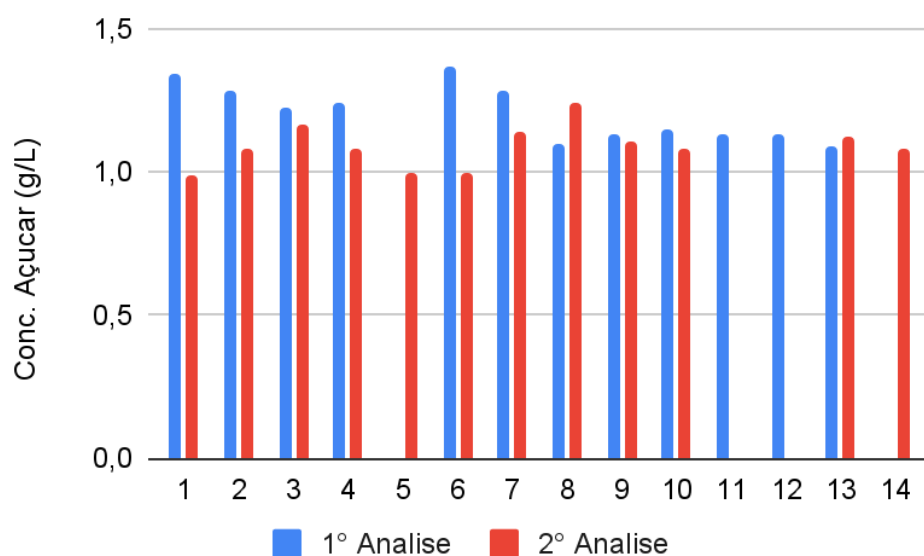
A partir de análises anteriores foi de rápida associação a presença de possíveis proteínas termossensíveis ainda presentes nessas soluções iniciais (Silva, 2024). Então, foi realizada uma precipitação térmica, deixando todas as amostras na estufa 45 °C por 24 horas. Gerando assim segundo conjunto de dados (Gráfico 3) e um comparativo em relação ao antes e depois da precipitação (Gráfico 4). Destaca-se que devido a problemas logísticos e operacionais, não foi possível obter os valores de algumas amostras.

Gráfico 3: Concentração de açúcares redutores no lisado após a precipitação térmica



Fonte: Autor, 2024

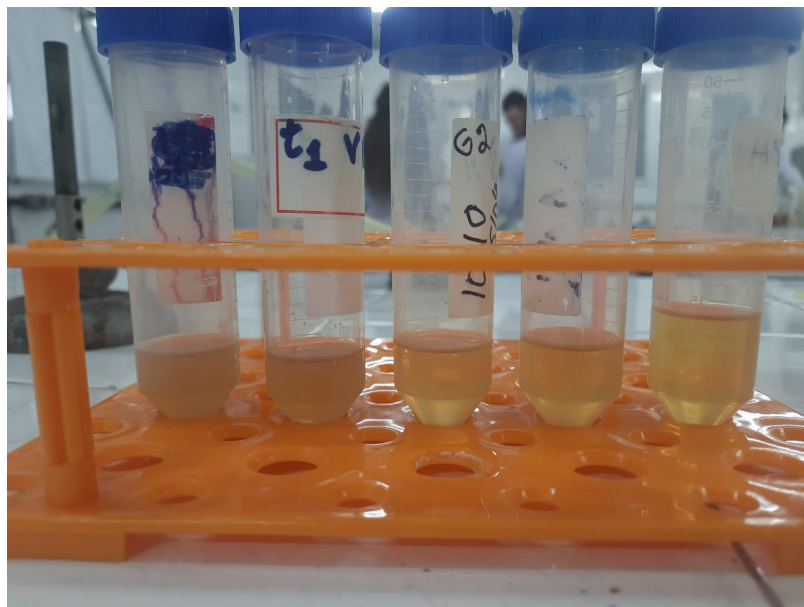
Gráfico 4: Comparativo do efeito da precipitação térmica sobre a quantidade de açúcares no tempo zero.



Fonte: Autor, 2024

Ao analisar o Gráfico 4, observa-se uma significativa redução na concentração total nos tempos iniciais de aproximadamente 0,20 g/l, equivalente a 15,52% da análise inicial. Porém, nos pontos a partir da amostra número 9, referente ao tempo de 5 horas, praticamente não é observada alteração, indicando que essas proteínas possivelmente precipitaram ainda durante a etapa de extração, sendo também relacionado à perda de turbidez da mistura obtida (Figura 7).

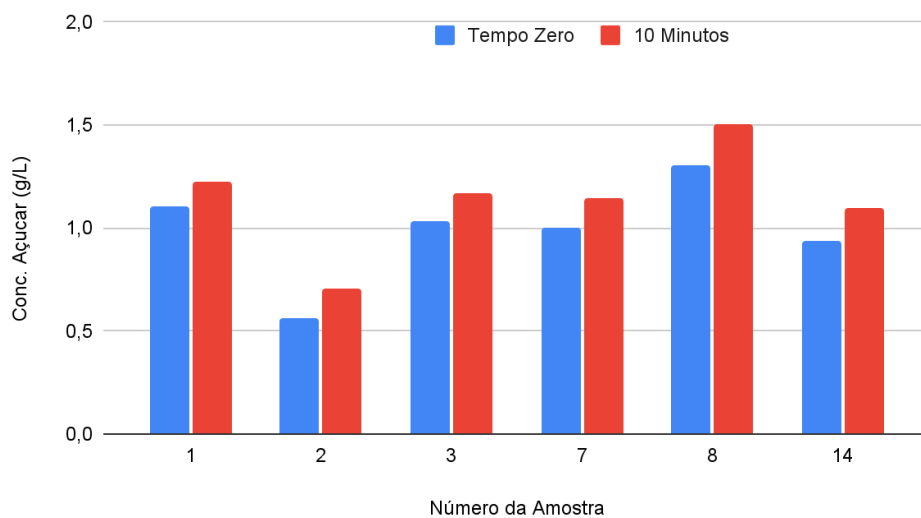
Figura 7: Comparativo de turbidez, amostras 1, 5, 10, 13 e 14, da esquerda para a direita antes da precipitação térmica.



Fonte: Autor, 2024

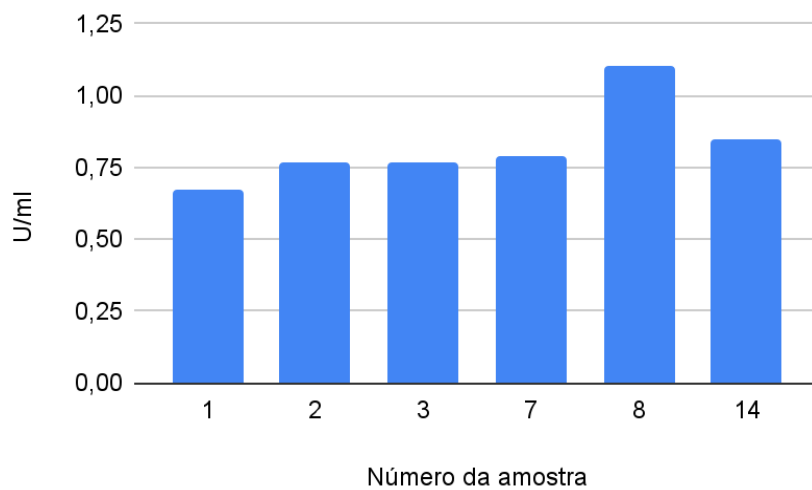
A atividade enzimática foi determinada para seis amostras em pontos distintos de tempo. Os valores estão presentes no Gráfico 6. A variação na atividade se mostrou muito pequena, tendo uma média de 0,780 U/mL. Este resultado indica que o tempo de extração não produziu efeito importante na recuperação de invertase e que, para tempos curtos de extração, uma etapa adicional de precipitação térmica pode melhorar a qualidade do lisado.

Gráfico 5: Concentrações de açúcares redutores no tempo zero e após 10 minutos de contato com a solução enzimática.



Fonte: Autor, 2024.

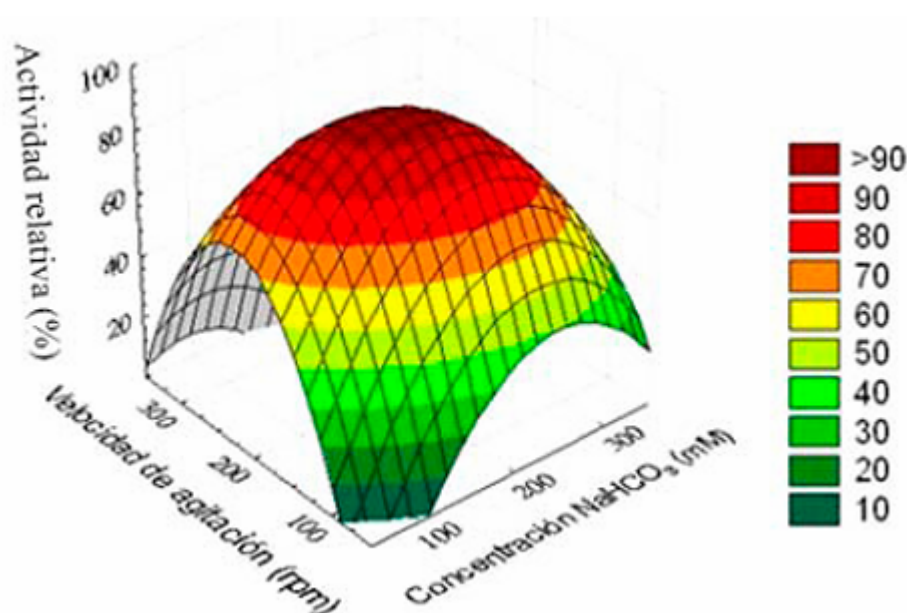
Gráfico 6: Atividade enzimática de invertase nas amostras.



Fonte: Autor, 2024.

Comparando os resultados com os obtidos por Ferreira *et al.* (2018), onde foi utilizado um método semelhante para extração, foi obtido um valor de 14,7 U/mg. Analisando com um modelo polinomial, Ferreira *et al.* (2018) mapearam uma zona de maior eficiência na extração da invertase na solução de NaHCO_3 (Figura 8), uma otimização referente à pesquisa de Toralles *et al.* (2014), mensurado em 8,86 U/mg, equivalente a 60% do atual.

Figura 8: Superfície de resposta para efeito interativo de NaHCO_3 (X_1) e da velocidade de agitação (X_2) no processo de extração de invertase (ILD) obtida por autólise de *S. cerevisiae* de purê de pêssego (ISc) da cv. Jubileu. a AR de 100% a 25°C e pH 5 igual a 14,7 U/mg.



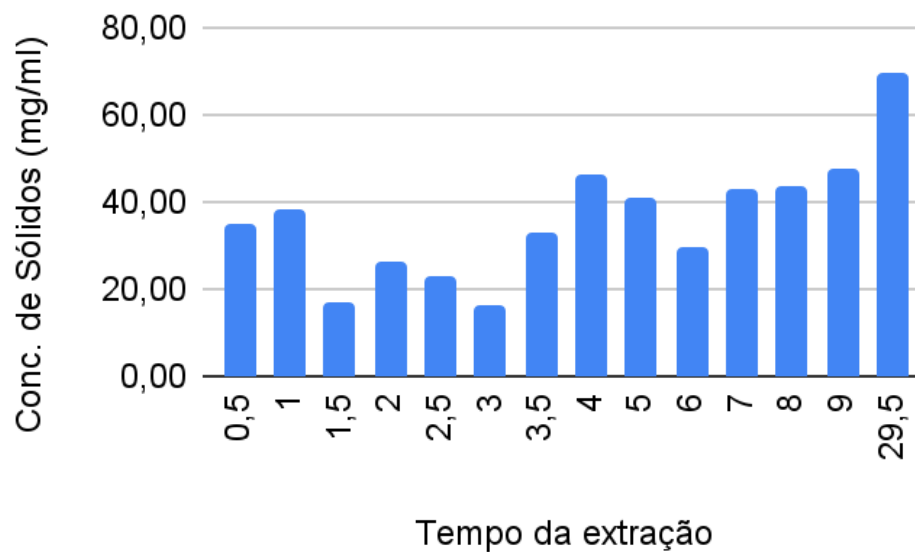
Fonte: Ferreira *et al.* (2018)

As condições utilizadas neste trabalho podem ser representadas no estudo de Ferreira *et al.* (2018) como o ponto $X_1 = 100$ mM e $X_2 = 0$ RPM. Comparando a média da atividade, 0,780 U/ml, com o padrão encontrado, tem-se uma equivalência a 5,30%, condizente com a faixa esperada para estas coordenadas, segundo Ferreira *et al.* (2018).

4.3 PESO SECO

Por causa do aumento da degradação das leveduras no meio ao longo do tempo, a quantidade de material sólido presente no lisado aumentou, fato observado por uma análise de peso seco, onde por mais que haja variação, é notável uma tendência ao aumento desse peso conforme o passar do tempo indicado no Gráfico 7.

Gráfico 7: Concentração de sólidos (mg/mL) no lisado em função do tempo de extração.



Fonte: Autor, 2024

Apesar de um início de maior concentração é observado uma tendência crescente na concentração de sólidos no meio, entretanto não é refletido em um aumento proporcional da atividade enzimática. Indicando que o efeito do tempo de extração eleva o grau de impurezas no meio, sendo recomendada uma etapa curta, a fim obter uma maior pureza da enzima.

5. CONCLUSÃO

A invertase pode ser categorizada como um subproduto da *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse método de extração tem como mecanismo principal a autodestruição da célula, é observada a liberação da invertase no início do método, entretanto contendo um alto teor de impurezas que afeta a leitura equipamento, tendo uma média de 1,28 g/l de açúcar reduzidos para 1,08 g/l após a precipitação, uma redução de 15,52%, para tempos menores que 4 horas. Efeito esse corrigido com tempos superiores às 4 horas, onde as proteínas termossensíveis precipitam causando uma redução de 11,78% comparado com os tempos iniciais, indicativos de uma etapa de purificação presente no método de extração. Observado um nível de atividade enzimática semelhante ao longo do tempo, indicando que tempos longos na etapa de extração favorece a solubilização de impurezas para o meio e não a obtenção da enzima, sendo assim preferível uma extração rápida seguido de uma etapa de purificação. Este trabalho proporcionou não só um desafio referente às habilidades com relação aos procedimentos analíticos, mas também qual o valor para o maior desenvolvimento de todo o conhecimento adquirido ao longo do curso, afirmando a importância de experiências anteriores no entendimento e na resolução de problemas futuros.

REFERÊNCIAS

AMAYA-DELGADO, L.; HIDALGO-LARA, M. E.; MONTES-HORCASITAS, M. C. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. **Food Chemistry**, v. 99, n. 2, p. 299-304, 2006.

COTOIA, A. *Saccharomyces cerevisiae*. 2020. Disponível em: <<https://biologydictionary.net/saccharomyces-cerevisiae/>>.

EDUARD Buchner Biographical. **The Nobel Prize**, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1907/buchner/biographical/>>. Acesso em: 15 out 2024.

FERREIRA, M. V.; ROSSLER, A. F.; TORALLES, R. P.; RUIZ, W. A.; ROMBALDI, C. V. Extracción optimizada y purificación parcial de invertasa aislada de *S. Cerevisiae* en puré de durazno. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 2, 22 2018.

ILLANES, A.; GORGOLLÓN, Y. Kinetics of extraction of invertase from autolysed bakers' yeast cells. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 8, n. 2, p. 81- 84, 1986.

INVERTASE: características, estrutura, funções - Maestrovirtuale.com. Disponível em: <https://maestrovirtuale.com/invertase-caracteristicas-estrutura-funcoes/?expand_article=1>. Acesso em: 27 ago. 2024.

MAGALHÃES, Lana. Enzimas. **Toda Matéria**, [s.d.]. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/enzimas/>. Acesso em: 15 out. 2024

MANNAZZU, I., GUERRA, E., STRABBIOLI, R., PEDICONI, D., FATICHENTI, F. The vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha* undergoes cellular reorganization during growth in, and recovery from, the presence of vanadate. *Microbiology*, v. 144, n. 9, p. 2589-2597, 1998.

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

MIRANDA, D.A; Yogui, G.T. 2012. Determinação gravimétrica de peso seco em amostras de sedimentos e tecidos biológicos. Procedimento Operacional Padrão Organo-MAR-2012-02, Revisão nº 1. Laboratorio de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, 7p.

ONU. Convenção Sobre Diversidade Biológica. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.rbma.org.br/anuario/pdf/legislacao_01.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2024.

RADZICKA, A.; WOLFENDEN, R. A proficient enzyme. *Science*, v. 267, n. 5194, p. 90-93, 1995.

SILVA, F. Consultoria da Prática: Sistema de Duas Fases Aquosas, Relatório de Estágio - Universidade Federal de Pernambuco. 2024 .

SILVA, R. DO N. et al. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 3, p. 337–341, dez. 2003.

TORALLES, R. P., KUHN, C. R., SÁ, P. S., RUIZ, W. A. Extração e caracterização parcial de invertase de levedura de purê e resíduo de pêssego. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 8, n. 2, pp. 1399-1414, 2014.

VITOLO, M. Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*). Dissertação (Mestrado em Tecnologia das Fermentações) - Universidade de São Paulo. 1979.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.