



Universidade Federal
de São João del-Rei

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM ESFERAS DE CARRAGENA

BRUNA PALOMA RIBEIRO

OURO BRANCO - MG

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAPEBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

BRUNA PALOMA RIBEIRO

IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM ESFERAS DE CARRAGENA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São João Del-Rei, na Qualificação do Projeto de Dissertação, como pré-requisito para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Demian Patrick Fabiano
Co-orientador (interno ao PPEQ): Prof. Dr. Edson Roman Nucci
Co-orientador (externo ao PPEQ): Prof. Dr. Brener Mangnabosco Marra

OURO BRANCO – MG
2022

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB) e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R894i Ribeiro, Bruna Paloma.
IMOBILIZAÇÃO DE MICROORGANISMOS EM ESFERAS DE
CARRAGENA / Bruna Paloma Ribeiro ; orientador
Demian Patrick Fabiano; coorientador Brener Mangnabosco
Marra. -- Ouro Branco, 2023.
54 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química) -- Universidade Federal de São João
del-Rei, 2023.

1. Imobilização de microrganismos. 2. Esferas de
Carragena. I. Patrick Fabiano, Demian, orient. II.
Mangnabosco Marra, Brener , co-orient. III. Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA N^o 3 / 2023 - PPGEQ (13.13)

N^o do Protocolo: 23122.001397/2023-71

Ouro Branco-MG, 12 de janeiro de 2023.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **BRUNA PALOMA RIBEIRO**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI, EM 22 DE DEZEMBRO DE 2022.

BANCA EXAMINADORA:

(Assinado digitalmente em 12/01/2023 20:22)

DEMIAN PATRICK FABIANO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DEQUI (12.29)

Matrícula: 1810291

(Assinado digitalmente em 12/01/2023 15:19)

EDSON ROMANO NUCCI

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DQBIO (12.26)

Matrícula: 1811284

(Assinado digitalmente em 12/01/2023 21:17)

JUAN CANELLAS BOSCH NETO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DEQUI (12.29)

Matrícula: 1742695

(Assinado digitalmente em 27/01/2023 15:15)

CINTHIA MARIA FELICIO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 966.313.506-97

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 3, ano:2023, tipo: NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA, data de emissão: 12/01/2023 e o código de verificação: e7bOe6ad7f

Agradecimentos

A Deus, por todo amparo a nós concedido, pois foram dias de dificuldade e luta e também por ter nos concedido saúde, vontade e força para vencer mais uma etapa.

À família, pelo apoio, incentivo, compreensão, amor e principalmente pelo companheirismo, sempre estando ao nosso lado em todas as situações.

Ao marido, Cleydson Baessa de Lima, que de forma especial e carinhosa nos deram força e coragem, nos apoiando nos momentos de dificuldades.

À Universidade Federal de São João Del Rei e a todos do Departamento de Engenharia Química.

Ao orientador Prof. Dr. Demian Patrick Fabiano, por nos ajudar com seus ensinamentos, orientação, apoio e aos coorientadores, pela compreensão, atenção e disponibilidade em todas as etapas do trabalho.

Aos demais professores, que ajudaram direta ou indiretamente, por todo conhecimento, dedicação e sabedoria concedidos para a realização desse trabalho e pelas sugestões para melhoria do mesmo.

Aos técnicos de laboratório, pelo ensinamento, paciência e pelo auxílio nas realizações dos experimentos.

Aos colegas e amigos, que nos ensinaram, incentivaram e ajudaram, contribuindo no decorrer desta tarefa e tornando possível concluir e vencer mais esta etapa de nossa vida.

A Universidade Federal de São João Del Rei e todos os seus professores que sempre proporcionaram um ensino de alta qualidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão do auxílio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

Resumo

A carragena é um polissacarídeo que apresenta estrutura central formada por galactose, diferentes proporções de grupos ésteres de sulfato e 3,6-anidrodgalactose, sendo muito utilizada nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, possuindo diversas características promissoras e apresentam uma alternativa bem completa para imobilização de células, possuindo excelentes propriedades de formação de gel. O presente trabalho teve como objetivo sintetizar as esferas de carragena e de imobilizar microrganismos em sua estrutura polimérica. Foram escolhidas duas leveduras *Saccharomyces pastorianus* e *Saccharomyces cerevisiae* com microrganismos imobilizados. As leveduras imobilizadas foram testadas na fermentação utilizando três substratos diferentes: o açúcar mascavo, o açúcar cristal e a D(+)sacarose. A síntese da esfera de carragena foi alcançada quando houve uma combinação das concentrações de duas soluções: da solução de carragena, na concentração de 10 g.L⁻¹ e da solução de KCl, na concentração de 0,848 mol. L⁻¹. Nessas mesmas concentrações foi possível imobilizar as leveduras na matriz polimérica da carragena e formar esferas. Os resultados das fermentações com as leveduras imobilizadas mostram que o consumo do açúcar ocorre por dois fatores: pela adsorção do açúcar na matriz polimérica da carragena, devido às interações eletrostáticas ocorrido entre eles e também pelo consumo do açúcar pelas leveduras imobilizadas. A sacarose foi o melhor açúcar para utilizar como substrato. Em relação aos microrganismos pode-se notar que *Saccharomyces cerevisiae* obteve resultados mais promissor, devido à maior velocidade e maior de consumo de açúcar, em comparação com a outra levedura. Esse maior consumo, podem ser explicados pela maior quantidade de células viáveis presentes dentro das esferas. Além disso, foram realizadas a secagem das esferas com as leveduras imobilizadas no dessecador, em estufa e naturalmente. Entretanto, as células após a reidratação das esferas não se mostram viáveis. Em vista de tudo isso pode-se concluir que células de microrganismos podem ser imobilizadas em esferas de carragena, entretanto, deve-se refinar o processo de imobilização para aumentar a viabilidade celular. Além disso, as células imobilizadas podem ser usadas e reutilizadas em processos biotecnológicos para produção de produtos de interesse.

Palavras-chaves: esfera de carragena; imobilização de microrganismos; leveduras; fermentação.

Abstract

The present work aimed to synthesize carrageenan spheres and to immobilize microorganisms in their polymeric structure. Two yeasts *Saccharomyces pastorianus* and *Saccharomyces cerevisiae* with immobilized microorganisms were chosen. The immobilized yeasts were tested in fermentation using three different substrates: brown sugar, crystal sugar and D(+)sucrose. The synthesis of the carrageenan sphere was achieved when there was a combination of the concentrations of two solutions: the carrageenan solution, at a concentration of 10 g.L⁻¹, and the KCl solution, at a concentration of 0.848 mol. L⁻¹. At these same concentrations, it was possible to immobilize the yeasts in the carrageenan polymeric matrix and form spheres. The results of the fermentations with immobilized yeasts show that the consumption of sugar occurs by two factors: by the adsorption of sugar in the polymeric matrix of the carrageenan, due to the electrostatic interactions between them and also by the consumption of sugar by the immobilized yeasts. Sucrose was the best sugar to use as a substrate. Regarding the microorganisms, it can be noted that *Saccharomyces cerevisiae* obtained more satisfactory results, due to the greater speed and greater consumption of sugar, in comparison with the other yeast. This higher consumption can be explained by the greater amount of viable cells present within the spheres. In addition, the spheres were dried with immobilized yeasts in the desiccator, in an oven and naturally. However, the cells after rehydration of the beads are not viable. In view of all this, it can be concluded that microorganism cells can be immobilized in carrageenan spheres, however, the immobilization process must be refined to increase cell viability. In addition, immobilized cells can be used and reused in biotechnological processes to produce products of interest.

Keywords: carrageenan sphere; immobilization of microorganisms; yeasts; fermentation.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BILIOGRÁFICA.....	7
2.1. AS ALGAS.....	7
2.2. MERCADO DE ALGAS (ALGICULTURA).....	7
2.3. CARRAGENA.....	9
2.3.1. <i>Solubilidade</i>	11
2.3.2. <i>Viscosidade</i>	12
2.3.3. <i>Gelificação</i>	12
2.4. IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS.....	13
2.4.1. <i>Ligação de Superfície</i>	14
2.4.2. <i>Aprisionamento dentro de uma Matriz Porosa</i>	15
2.4.3. <i>Aglomerção</i>	15
2.5. ESFERAS	15
2.6. IMOBILIZAÇÃO UTILIZANDO A CARRAGENA	17
2.7. LEVEDURA DA ESPÉCIE <i>SACCHAROMYCES PASTORIANUS</i>	19
2.8. MEIO SINTÉTICO DE CULTURA	20
2.8.1. <i>AÇÚCAR CRISTAL</i>	20
2.8.2. <i>AÇÚCAR MASCAVO</i>	21
2.8.3. <i>SACAROSE</i>	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. FORMAÇÃO DAS ESFERAS.....	22
3.2. IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS	22
3.3. MEIOS DE CULTURA SINTÉTICO	23
3.4. FERMENTAÇÃO.....	24
3.5. SECAGEM DAS ESFERAS DE CARRAGENA	25
3.6. VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

4.1. FORMAÇÃO DAS ESFERAS DE CARRAGENA.....	27
4.2. ATIVIDADE NA FERMENTAÇÃO.....	28
<i>4.2.1. Açúcar mascavo</i>	<i>28</i>
<i>4.2.2. Açúcar cristal.....</i>	<i>29</i>
<i>4.2.3. Sacarose</i>	<i>31</i>
4.3. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS	35
4.4. SECAGEM DAS ESFERAS	37
4.5. VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS.....	38
5. CONCLUSÕES.....	40
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
APÊNDICE	40

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismo de gelificação da carragena (GELYMAR, 2015).....	12
Figura 2. Principais métodos de imobilização celular (GONDIM, 2009).....	14
Figura 3. Esferas de carragena sintetizadas com as melhores concentrações das soluções de carragena e de KCl (Autora, 2022).....	28
Figura 4. Experimentos realizados com a <i>Saccharomyces pastorianus</i> e o açúcar mascavo, com a temperaturas média de 29 °C.	29
Figura 5. Experimentos realizado com a <i>Saccharomyces pastorianus</i> e o açúcar cristal, com a temperaturas média de 29 °C.	30
Figura 6. Experimentos realizado com a <i>Saccharomyces pastorianus</i> e a sacarose, com a com temperatura média de 29 °C.....	32
Figura 7. Experimentos de reuso realizado com a <i>Saccharomyces pastorianus</i> e a sacarose, com a com temperatura média de 29 °C.	33
Figura 8. Experimentos realizado com a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e a sacarose, com a com temperatura média de 29 °C.....	34
Figura 9. Experimentos de reuso realizado com a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e a sacarose, com a com temperatura média de 29 °C.	34
Figura 10. Fotos das esferas de carragena com levedura imobilizada após a secagem (a) no dessecador, por 48 horas; e (b) na estufa a 35°C, 24 h.	37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Aplicações da Carragena (AGARGEL, 2015).....	9
Tabela 2. Algas com seus produtos e respectivas estrutura química (OLIVEIRA, 2017). 10	
Tabela 3. Solubilidade da carragena em diferentes meios (SANTOS; BRUNIERA; GARCIA, 2008).	11
Tabela 4. Características dos géis de carragena (AGARGEL, 2015).....	13
Tabela 5. Concentrações de leveduras para os testes de fermentação.....	23
Tabela 6. Composição do meio de cultura sintético	23
Tabela 7. Porcentagens (%) de consumo de substrato (°Brix) ao final dos experimentos. 35	
Tabela 8. Porcentagens de células viáveis em diferentes etapas dos experimentos.	38
Tabela 9. Massa de carragena e de cloreto de potássio testadas nos experimentos de síntese de esferas de esferas.	40

1. INTRODUÇÃO

Com o avanço da área da microbiologia, a utilização de microrganismos em processos biotecnológicos e em pesquisas tem aumentado, com isso, têm-se estudado formas para a potencialidade dos microrganismos, sendo necessário que estejam disponíveis, fácil transporte e que mantenham suas características e viabilidade celular no processamento (BASSANI, 2018).

Dentre esses métodos podemos destacar a imobilização de células que consiste em preservar as características das células mantendo suas atividades catalíticas possibilitando uma reutilização das mesmas. Nos processos fermentativos utiliza-se células livres em suspensão, porém no uso de células/microrganismos imobilizados ocorre o aumento de produtividade devido a elevada concentração de células, reutilização das células por vários ciclos, aumenta a eficiência da fermentação, melhora da qualidade do produto e redução dos impactos ambientais (GEISE, 2015; COVIZZI *et al.*, 2007).

Carrageninas ou carragenanos são uma família de polissacarídeos lineares sulfatados obtidos a partir de extratos de algas marinhas vermelhas (rodófitas), conhecidas por algas carragínófitas, comuns nas costas de áreas oceânicas temperadas. A carragena é utilizada na produção de alimentos (indústrias lácteas e embutidos) para fabricação de gelatinas e geleias (ARGAGEL, 2022).

A classificação da carragena de acordo com as estruturas moleculares são *Lambda* (λ), *Kappa* (κ) e *Iota* (ι). Possui várias aplicações: gelificante, espessante, agente de suspensão e estabilizante e possui um diferencial das outras gomas, a interação eletrostática entre grupos éster-sulfato nas proteínas do leite e utilizado como ligante natural para embutidos na indústria de carnes (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2020). As carragenas *Iota* e *Kappa* podem formar géis em água em temperatura ambiente sem refrigeração e a carragena *Lambda* é utilizada como agente espessante a frio ou a quente (NUNES *et al.*, 2003).

A carragena apresenta-se como uma alternativa bem completa para imobilização de células, devido, possuir excelentes propriedades de formação de gel e aprisionamento de compostos (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2020).

A imobilização celular é a adesão/confinamento de células microbianas viáveis dentro de uma matriz, preservando suas atividades catalíticas, ocorrendo naturalmente em vários habitats. Pode-se, ser compreendida como aprisionamento de um microrganismo ou enzima em uma determinada matriz conhecida como suporte (podendo ser pectina, géis, crisólita (tipo de amianto conhecido por ter uma estrutura fibrosa, flexível, fina e sedosa), materiais cerâmicos, resíduos agroindustriais) (GEISE, 2015).

A fermentação alcoólica é um processo amplamente utilizado na produção de bebidas alcoólicas, como cervejas e vinhos. Esse processo é realizado por microrganismos, principalmente leveduras, que convertem açúcares em álcool e dióxido de carbono. Para aumentar a eficiência da fermentação, a imobilização de células de leveduras pode ser uma estratégia interessante, pois permite a utilização de células imobilizadas, que podem ser reutilizadas, além de possibilitar uma melhor eficiência na fermentação.

Nesse contexto, a carragena é um polissacarídeo extraído de algas marinhas vermelhas que tem sido amplamente estudado como matriz de imobilização de células de microrganismos, devido à sua capacidade de formar géis estáveis e porosos. No entanto, para utilizar efetivamente a carragena como matriz de imobilização, é necessário encontrar a combinação adequada de concentrações de carragena e outros componentes do meio de cultura, bem como o método ideal de secagem.

O objetivo deste trabalho é avaliar diferentes combinações de concentrações de carragena e outros componentes do meio de cultura, bem como diferentes métodos de secagem, para imobilização de células de leveduras em esferas de carragena. Para isso, foram testadas diferentes concentrações de carragena e KCl, bem como três tipos de açúcares (sacarose, açúcar cristal e açúcar mascavo) em um meio sintético. Além disso, foram testados três métodos de secagem das esferas de carragena imobilizadas. Os objetivos específicos são:

- Sintetizar e caracterizar esferas de carragena;
- Imobilizar microrganismos nas esferas;
- Analisar a atividade dos microrganismos imobilizados;
- Verificar a viabilidade dos microrganismos imobilizados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. AS ALGAS

As algas são organismos que realizam a fotossíntese e produzem sua própria energia para o funcionamento do seu metabolismo. Podem ser encontradas em mar, lagos, rios e outros ambientes aquáticos, ser de tamanhos microscópicos e são consideradas plantas aquáticas, ser dividida em unicelulares (microalgas) ou multicelulares (macroalgas). Uma outra divisão utilizada é pela coloração, características que as diferenciam em algas vermelhas (Filo *Rhodophyta*), algas verdes (Filo *Chlorophyta*) e algas pardas (Filo *Ochrophyta*). Sua produção não exige trabalho específico, produzindo em um hectare cerca de aproximadamente 20 mil quilos de alga seca por ciclo de produção (ALMEIDA; CARNEIRO, 2020).

Possuem uma grande importância economicamente e ecologicamente, devido seu filtro natural para melhorar a qualidade da água, absorvendo nutrientes resultantes da decomposição de matéria orgânica utilizada em seu desenvolvimento. Na indústria, são matérias-primas para diversos produtos: alimentos, bebidas, remédios, tintas, fertilizantes e rações para animais. Nos países orientais, utiliza-se em molhos, sopas, carnes e na elaboração do sushi (BASÍLIO, 2020).

As algas estão ganhando destaque devido seus atributos comerciais, principalmente seus polissacarídeos sulfatados. Os extratos das macroalgas *Gracilaria spp*, *Hypnea spp.*, *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum spp.*, denominados ágar/agarose, carragena e alginato, respectivamente. Sendo utilizados como ingredientes na indústria alimentícia e de cosméticos, por apresentarem propriedades emulsificantes e estabilizantes. As algas mais utilizadas são as marinhas devido reunir todas as funcionalidades, podendo-se destacar a espécie mais comercializada que é a *Kappaphycus alvarezii*, fonte da carragena, sendo seus polissacarídeos utilizados como estabilizantes em sorvetes, achocolatados, cervejas e vinhos; espessante (ALMEIDA; CARNEIRO, 2020).

2.2. MERCADO DE ALGAS (ALGICULTURA)

De acordo Plano de Desenvolvimento da Aquicultura (2015-2020), a produção mundial com o pescado foi de 158 milhões de toneladas, sendo 136,2 milhões de toneladas

para consumo humano, onde 69,6 milhões de toneladas (51,1%) tiveram origem na pesca e 66,6 milhões de toneladas (48,9%) de origem na aquicultura.

Os cultivos de algas marinhas são bem recentes no Brasil, porém, possui grande valor de mercado com potencial para produção de cosméticos e produtos alimentícios. Segundo a FAO (2014), em 2013 ocorreu uma produção de 23,8 milhões (peso úmido) de algas cultivadas que foram colhidas em 33 países para alimentação direta e processamento, com uma estimativa de 6 milhões de dólares (PLANO DE DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA BRASILEIRA, 2015).

De acordo com o relatório Fish 2.0 (2017), o mercado de algas em 2023 pode chegar até em US\$44,7 bilhões, ocorrendo uma mudança nas indústrias, devido, sua transformação de luz solar e o dióxido de carbono em gorduras (STARTSE, 2017).

As indústrias de algas marinhas mais produtivas estão localizadas na Ásia, devido, baixos custos laboratoriais, combinantes com técnicas simples e inteligentes de industrialização (PLANO DE DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA BRASILEIRA, 2015).

O cultivo de macroalgas no Brasil ocorre em quatro estados: Rio de Janeiro, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Norte. No Rio de Janeiro e São Paulo, são responsáveis pelo cultivo da espécie *Kappaphycus alvarezii* e Ceará e Rio Grande do Norte pela *Gracilaria* spp. Ressalta-se que o potencial da algicultura estende por todo litoral brasileiro e também, existem outros gêneros de macroalgas presentes no litoral nordestino como a *Hypnea musciformis* e o *Sargassum* spp (PLANO DE DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA BRASILEIRA, 2015).

Com o aumento da produção de pescados nos últimos anos, houve um aumento significativo na aquicultura. O Brasil está no 12º como maior produtor mundial em aquicultura, com 8.500 km de costa marítima e 23 km de água doce, considerado privilegiado pela diversidade e suas características, podendo avançar muito no ranking. O cultivo de algas (algicultura) no Brasil é em pequena escala ainda, porém possui grande valor de mercado sendo utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica, na produção de cosméticos. A goma carragena é extraída da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*. No Brasil, sua produção principal se concentra no Litoral Fluminense, tendo produtos adjacentes no Rio de Janeiro, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Norte, responsáveis pelo cultivo da alga *Gracilaria* spp. Existe a produção de outros gêneros de macroalgas *Hypnea musciformis* e o *Sargassum* spp. no litoral nordestino (PLANO DE DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA BRASILEIRA 2015/2020).

2.3. CARRAGENA

A carragena é um polissacarídeo que apresenta uma estrutura central formada por galactose, diferentes proporções e localizações de grupos ésteres de sulfato e na proporção de 3,6-anidrogactose sendo obtido de algas vermelhas do tipo *Rhodophyceae* descoberto em 1785, na cidade de Carragena, no norte da Irlanda, utilizada para aumentar a viscosidade do leite. Existem diversas frações de carragenas, com isso, os pesquisadores sugeriram sistemas de nomenclatura baseando-se na estrutura química dos polissacarídeos. A coleta das algas é realizada manualmente em zonas intermareais ou por meio do mergulho com equipamentos adequados. Em seguida, as algas são colocadas no sol para secagem para atingir uma umidade ideal (ANTUNES; CANCHOS, 1984).

A carragena é bastante utilizada no setor alimentício e farmacêutico com inúmeras aplicações mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Aplicações da Carragena (AGARGEL, 2015).

Aplicações da carragena	
Géis de sobremesa	Medicamentos (leite de magnésia, laxantes, xaropes)
Geleias de baixo valor calórico,	Rações para animais
Géis para produtos de consumo à base de peixe	Odorizador de ar
Balas de Goma	Sorvetes
Sucos de frutas e concentrados em pó	Cobertura açucarada, Recheio de tortas,
Temperos	Massas de pão e bolo
Crems para café e tipo chantilly	Tintas
Molhos para pizzas	Produtos de Limpeza
Fórmulas para bebês,	Embutidos cárneos (presunto, apresuntado, mortadela, hambúrguer, patês, aves e carnes processadas)
Loções e cremes, xampus, cremes dentais	Molhos de salada e sopas em pó

A extração da carragena de algas vermelhas carraginófitas podem ser dos gêneros *Kappaphycus*, *Gigartina*, *Eucheuma*, *Chondrus* e *Hypnea*. Com isso, sua estrutura central é formada por galactose diferenciando em relação a proporção e localização de grupos ésteres de sulfato e 3,6-anidrogactose onde apresenta três tipos principais: *Kappa*, *Iota* e *Lambda*, sendo o mais utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, petroquímica entre outras

(OLIVEIRA, 2017). Na Tabela 2 apresenta as algas que dão origem a carragena e suas estruturas químicas.

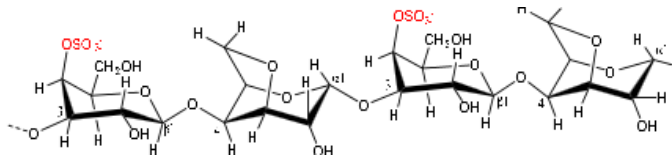
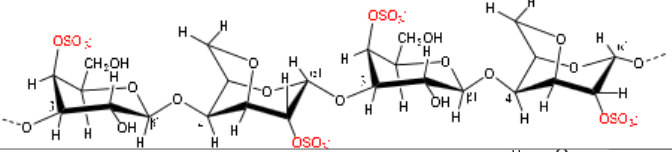
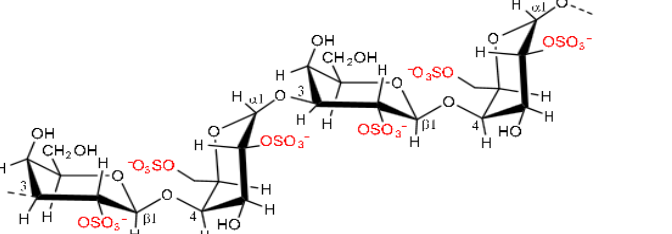
Esse aditivo é bastante utilizado nas indústrias alimentícias, principalmente em produtos cárneos e lácteos (PEDROSA; DEMIATE, 2008), apresentando diversas vantagens: 1) alto poder de absorção; 2) retenção da umidade natural do produto, assim eliminando perda de líquidos, com isso, prolonga a suculência e sua característica geleificante; 3) redução da água livre; 4) substituição de gordura pela carragena em produtos light e diet (SANTOS *et al.*, 2008).

Segundo Villanueva e Montañó (2003), a carragena é uma mistura complexa de no mínimo 5 polímeros, denominados *Kappa* (K), *Lambda* (l), *Mu* (m), *Iota* (i) e *Nu* (n), sendo classificada de acordo com sua estrutura e propriedades físico-química:

- *Kappa*: gel rígido, quebradiço, termorreversível, alta força de gel, apresenta sinérese.
- *Iota*: gel elástico, termorreversível, não apresenta sinérese, propriedade tixotrópica.
- *Lambda*: solúvel a frio, não gelificante, produz altas viscosidades.

Onde a K e ι -carragena são os mais importantes no ramo alimentício.

Tabela 2. Algas com seus produtos e respectivas estrutura química (OLIVEIRA, 2017).

Origem	Produtos	Estrutura Química
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	κ –Carragena	
<i>Eucheuma spinosum</i>	ι –carragena	
<i>Gigartina</i> spp. <i>Chondrus</i> spp	λ –carragena	

As carragenas *Iota* e *Kappa* podem formar géis em água em temperatura ambiente sem refrigeração e a *Lambda* é utilizada como agente espessante a frio ou a quente (NUNES *et al.*, 2003).

2.3.1. Solubilidade

O principal solvente para a carragena é a água, porém isso dependerá de vários fatores (temperatura, presença de íon e o tipo de carragena) e são insolúveis em solventes orgânicos (FERREIRA e SOLER, 1992). Na Tabela 3 apresenta as solubilidades das principais carragenas em diferentes meios.

Tabela 3. Solubilidade da carragena em diferentes meios (SANTOS; BRUNIERA; GARCIA, 2008).

Meio	<i>Kappa</i>	<i>Iota</i>	<i>Lambda</i>
Água Fria	Solúvel ¹	Solúvel ¹	Solúvel
Leite Quente	Solúvel	Solúvel	Solúvel
Leite Frio	Insolúvel ²	Insolúvel ²	Insolúvel
Soluções de açúcar a frio	Solúvel ³	Insolúvel	Insolúvel
Soluções de açúcar a quente	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel*
Soluções Salinas	Insolúvel	Solúvel	
Com solvente em água (álcool, glicerina, entre outros)	Solúvel, quando umedecido no solvente e depois adicionado a água	Solúvel, quando umedecido no solvente e depois adicionado a água	Solúvel, quando umedecido no solvente e depois adicionado a água

¹ - K⁺ e Ca⁺⁺ de *Kappa* e *Iota* geralmente não são solúveis, mas considera-se solúvel pois se expandem e quando a viscosidade a frio é a mesma após seu aquecimento e resfriamento, são consideradas solúveis em água fria.

² - somente solúvel em presença de pirofosfato de tetrassódio (TSPP).

³ - concentração de sacarose de 65% a 70°C.

* - Na teoria são solúveis, mas na prática podem conter um baixo teor de *Kappa*, tornando-a insolúvel.

A carragena dos tipos *Kappa* e *Iota* possuem uma interação com os íons de potássio, acima de pH 4,5, as soluções de carragena são estáveis porque as condições de processamento não são capazes de afetá-las e são apropriadas para utilização em produtos ácidos (IMESON, 2000 apud SHARMA *et al.*, 2022) . E o cálcio, aumentando a dureza, fragilidade, temperatura de gelificação e a sinérese dos seus géis em água. Já os sais de

sódios não modificam a textura dos géis e os íons de sódio e potássio de polifosfatos e citratos ajudam na solubilidade em soluções frias e quentes, diminuindo a viscosidade através do sequestro dos íons divalentes e estabilizam em meios ácidos (SANTOS; BRUNIERA; GARCIA, 2008).

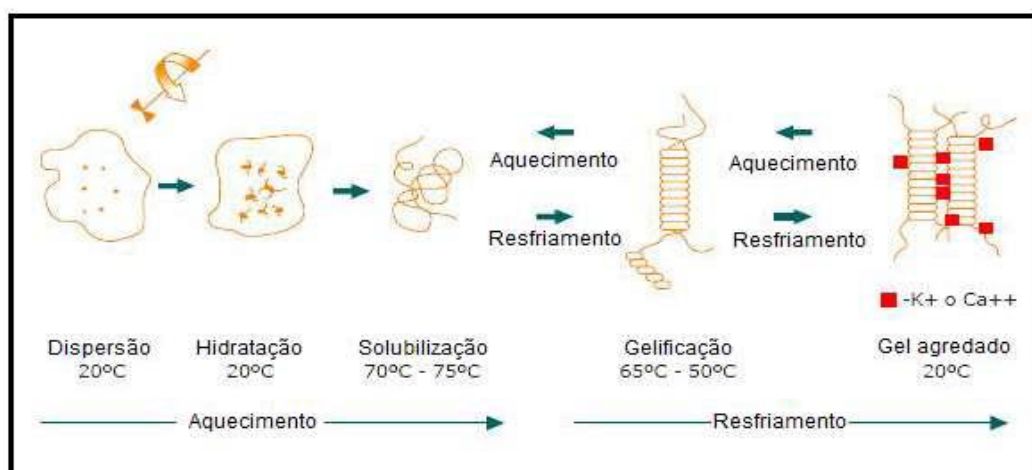
2.3.2. Viscosidade

A viscosidade da carragena varia de 5 a 800 cP (centi Poise), medida a 75 °C em uma concentração de 1,5%. A essa temperatura não ocorre a gelificação. E quando ocorre o aquecimento da mesma com posterior resfriamento, a viscosidade aumenta gradualmente até alcançar a temperatura de gelificação formando um gel resistente. Sua variação irá depender da concentração, temperatura, presença de outros solventes, tipo de carragena e peso molecular (NUNES *et al.*, 2003).

2.3.3. Gelificação

Em meio aquoso ocorre a formação de coloides e géis por meio de concentrações baixas. A Lambda atua como agente espessante a frio ou quente e Iota e Kappa são utilizados como agentes espessantes em produtos de alta temperatura, resultando em géis estáveis e transparentes obtendo uma variedade de texturas (desde elásticas até géis firmes). O poder de gelificação da Carragena é maior no leite devido a interação com a caseína produzindo um efeito sinérgico (FERREIRA; SOLER, 1992). A Figura 1 apresenta o mecanismo de gelificação da carragena do tipo kappa e iota.

Figura 1. Mecanismo de gelificação da carragena (GELYMAR, 2015)



As soluções quentes de carragena kappa e iota formam géis termo sensíveis depois que ocorre o resfriamento, podendo ser explicado por meio da formação de uma estrutura de dupla hélice pelos polímeros da carragena. Já em temperatura acima da fusão do gel, os polímeros de carragena ficam na solução como espirais aleatórios. No resfriamento, os polímeros tridimensionais são formados por hélices duplas constituindo os pontos de junção das cadeias de polímero e quando ocorre um resfriamento adicional causa a agregação dos pontos de junção para formar a estrutura de gel tridimensional. Ressalta-se que é importante a presença de alças na cadeia bem como o número, tipo e posição dos grupos de éster sulfato para propriedades de gelificação. Utiliza-se sais de potássio ou cálcio para obtenção do gel em água, em leites não são necessários (GELYMAR, 2015).

Na Tabela 4 são apresentadas as características dos géis das carragena conforme proposta de Agargel (2015).

Tabela 4. Características dos géis de carragena (AGARGEL, 2015).

Características	<i>Kappa</i>	<i>Iota</i>	<i>Lambda</i>
Efeito dos cátions	Gel mais forte com os íons de potássio	Gel mais forte com os íons de Cálcio	Não gelifica
Tipo de Gel	Forte e quebradiço com sinérese	Elástico e coesivo sem sinérese e tixotrópico.	Não gelifica
Estabilidade de congelamento/ descongelamento	Não tem	Estável	Não tem

2.4. IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS

A imobilização celular é a adesão/confinamento de células microbianas viáveis dentro de uma matriz preservando suas atividades catalíticas, ocorrendo naturalmente em vários habitats. Pode-se também, ser compreendida como aprisionamento de um microrganismo ou enzima em uma determinada matriz (GIESE, 2015).

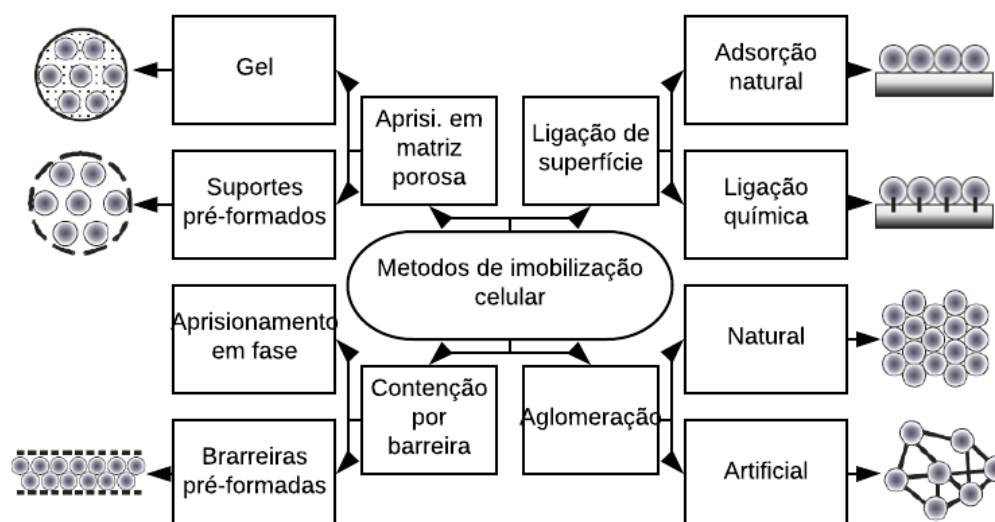
Sendo divididas em naturais e artificiais. A natural ocorre com a formação de biofilmes e adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais e também, ocorre espontaneamente em meio por meio de interações eletrostáticas. Já a artificial é realizada as encapsulações com alginato de cálcio e as ligações das células nas matrizes é feita por meio de ligações covalente utilizando agentes ligantes (glutaraldeído) (OLIVEIRA, 2011).

Com o crescente aumento da utilização da imobilização celular, pode-se notar diversas vantagens, como: aumento do período de tempo da atividade e estabilidade do biocatalisador; favorece processos fermentativos, diminui os custos e tempo de produção; aumenta a afinidade do microrganismo pelo substrato; aumenta a tolerância em concentrações elevadas de substratos e compostos tóxicos; permite fermentações em temperaturas mais baixas; facilidade de recuperação dos produtos e separação celular do mosto; reuso de biocatalisador sem remoção do tanque fermentativo; diminui o risco de contaminação microbiológica, devido à alta concentração de células e diminuição do tempo de maturação de alguns produtos (COVIZZI *et al.*, 2007).

A imobilização de células é muito utilizada em diversas aplicações, como: produção de pigmentos; produção de enzimas; biodegradação; biotransformação; redução de sulfatos; produção de vinhos doces; produção de leite fermentado; produção de sucos e refrigerantes entre outros (COVIZZI *et al.*, 2007).

De acordo Gondim (2009), existem quatro métodos de imobilização: ligação de superfície, aprisionamento em matriz porosa, contenção por membrana e aglomeração. Esses métodos estão detalhados na Figura 2, de modo existirem oito subclassificações para métodos de classificação.

Figura 2. Principais métodos de imobilização celular (GONDIM, 2009)



2.4.1. Ligação de Superfície

A ligação de superfície utiliza o suporte sólido por forças eletrostáticas ou por ligação covalente entre membrana celular e o suporte (materiais celulósicos: DEAE-celulose,

madeira, serragem; materiais inorgânicos: porcelana porosa, vidro poroso), ressaltando que a escolha do suporte dependerá das propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzimas e custos. Destaca-se a principal vantagem desse método é a facilidade de realizar este tipo de imobilização (LIMA, 2019).

2.4.2. Aprisionamento dentro de uma Matriz Porosa

No aprisionamento dentro de uma matriz porosa ocorre por meio da penetração das células na matriz porosa até que a mobilização seja obstruída por outras células ou que se forme material poroso em uma cultura de células, através de uma rede rígida evitando que as células se difundam para o meio circundante (LIMA, 2019). No trabalho proposto utilizou-se o aprisionamento de matriz porosa, devido ser utilizado para fermentação e também, por ser utilizados em imobilização o de géis de polissacarídeos (k-carragena, ágar e alginato. (MISHRA *et al.*, 2016).

2.4.3. Aglomeração

A aglomeração ocorre por meio do envolvimento a agregação ou a floculação das células de maneira natural ou artificialmente induzida sem a necessidade de um suporte de imobilização. Esse método depende diversos fatores, como composição da parede celular, pH, oxigênio dissolvido e composição do meio. (GROBOILLOT *et al.*, 1994).

2.4.4. Contenção por barreira

A contenção por barreira é conhecida como encapsulamento, utiliza-se membranas pré-formadas (reatores do tipo *hollow fiber*) ou formação *in situ* da membrana em torno das células a serem imobilizadas. Possuem vantagem de maior capacidade de contenção de células e prevenção da perda de células para o meio de fermentação (KAREL *et al.*, 1985).

2.5. ESFERAS

Segundo Gomes (2007), mostrou a imobilização de esporos bacterianos de uma linhagem de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana e avaliação germinação dos esporos, a

eficiência das células livres e imobilizadas dessa linhagem biodegradando em n-hexadecano. Ressalta-se que a imobilização dos esporos foi viável e reprodutível, sendo resistentes a quitosana e ao alto tratamento de fabricação das esferas e germinaram na presença de glucose.

Duarte (2015), propôs o desenvolvimento de esferas de alginato/pectina com centro líquido por meio da esterificação inversa, com isso, utilizaram amido de milho (1,5%, 2,0%, 2,5% e 3,0%) e diferentes concentrações de sacarose (15%, 32%, 45% e 64%) na formulação da solução do preparado. Notou-se que porcentagens abaixo de 1,5% não favorece a formação das esferas e a quanto ao uso da sacarose, nas condições realizadas, percebeu-se que quanto maior concentração dessa, menor será a viscosidade do preparado. Nesse caso a melhor porcentagem foi de 32% e os *bubbles* produziram melhores esferas com porcentagem de 3,0%, sendo esferas mais esféricas e firmes.

Dalponete e colaboradores (2016), realizaram a produção de esferas de alginato de cálcio contendo TiO_2 (dióxido de titânio) imobilizado, avaliando quanto ao poder de factibilidade de produção, características morfológicas e ao seu poder de degradação do corante azo amarelo tartrazina (amarelo ácido 23). Os resultados encontrados que correspondem a produção de esferas contendo TiO_2 são viáveis com 1 a 2 % de TiO_2 e após a secagem apresentaram menor porosidade que o TiO_2 em pó sendo confirmados através das imagens de esferas contendo parte das partículas de TiO_2 na sua superfície. Isso aconteceria, segundo esses autores, devido a ausência de poros e pelo menor rendimento de fotodegradação com usos de esferas catalíticas (15,1% moléculas iniciais de corante) do que o estudo com o uso de TiO_2 em pó (97%). Com isso, para o mesmo rendimento em pós e na forma imobilizada precisaria de 6,4 vezes maior de TiO_2 na forma imobilizada.

Ortiz (2017), pesquisou a imobilização celular por aprisionamento em alginato de cálcio em levedura *Saccharomyces cerevisiae* com nanopartículas magnéticas de magnetita. Ocorreu a realização da imobilização celular da levedura com o alginato de cálcio e as partículas magnéticas, sendo que a presença da magnetita no suporte não impediu a formação da estrutura gelatinosa do alginato. A caracterização das esferas imobilizadas mostrou que a superfície das esferas possui aspecto rugoso e irregular, com presença de cavidades diferentes formatos e tamanhos, através da microscopia eletrônica de varredura.

Bassani (2018), realizou um estudo de técnica de imobilização celular com as células *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* sendo aprisionadas em esferas de alginato de

cálcio em diferentes condições de armazenamento por 240 dias. Observou-se a formação de esferas de diâmetro uniforme (diâmetro médio de 3,52 mm) e eficiência de imobilização superior a 99%. As esferas úmidas obtiveram formato esférico com pequenas irregularidades na superfície e nas esferas liofilizadas com superfície enrugada e sulcos bem definidos, sendo possível a observação de células aglomeradas entre os poros. Em relação, ao aprisionamento, quando feito úmido sob refrigeração e liofilizadas sob congelamento mostram-se viáveis e mantiveram a estabilidade bioquímica durante 240 dias de armazenamento.

Jesus (2018) observou que esferas produzidas com alginato 2% apresentaram homogeneização, formato esférico regular e textura adequada. Já a concentração de 1% as partículas apresentaram leves pontas, com aspecto de gota e menor diâmetro e a concentração de 3% ficaram achatadas, quando utilizadas $CaCl_2$ 10% e viscosidade elevada devido ao gotejamento lento (12 h para transferir 50 mL) podendo inviabilizar o processo de produção e a utilização das esferas nos cultivos microalgas.

Schafranski (2019), realizou mostra a extração de compostos fenólicos de folhas de amoreira preta para posterior encapsulamento de alginato de cálcio a partir dos extratos foram encapsulados em esferas de alginato de cálcio e avaliado vários parâmetros (testes de eficiência de encapsulamento, liberação do princípio ativo em água, estabilidade no armazenamento e caracterização das esferas). Observou-se que é possível a extração do encapsulamento em esferas de alginato de sódio e a otimização do processo de extração dos compostos fenólicos e o encapsulamento, mostrou-se eficiente em concentração 1,5% m/v produzindo melhores esferas.

Santos (2020), relata a utilização da microalga *Chlorella vulgaris* para remoção de nitrogênio na forma de nitrato e amônia de esgotos domésticos, através da imobilização de esferas de alginato de cálcio. Os resultados indicaram a remoção de 85,19% de amônia e 30,95% de nitrato do efluente, tendo um aumento de pH (7,05 para 9,25), que poderia ser atribuído, conforme discute, devido a atividade fotossintética dessa microalga.

2.6. IMOBILIZAÇÃO UTILIZANDO A CARRAGENA

Calik e colaboradores (1999) realizaram um estudo que buscam avaliar a utilização de k-carragena na imobilização de *Pseudomonas dacunhae* para produção de L-alanina,

utilizando condições de operação de pH (7-7,5), temperatura (299 K) e uma concentração de k-carragena (3 a 5 %). Foi possível perceber, segundo os autores que o sucesso do processo depende da atividade inicial das células a serem imobilizadas e o procedimento de imobilização ocorre uma alta retenção da atividade da enzima e alta estabilidade de preparação. Desse modo, segundo esses autores, foi possível notar que houve uma melhor interação com tamanho da esfera 3 mm, sendo que o efeito diminui com a diminuição do tamanho do pellet.

Segundo Pramanik e colaboradores (2011), ao pesquisarem os efeitos do aprisionamento de ácido nucléico em três culturas mistas em tratamento biológico de águas residuais, notaram-se que as esferas de carragena desintegravam-se em 4 a 6 dias e concluíram que o aprisionamento da carragena modificou a comunidade bacteriana mais do que a de alginato e PVA (35-80% contra 0-35%).

Segundo Sankalia (2005), ao examinar a influência de vários parâmetros do processo de aprisionamento da α -amilase em grânulos de carragena reticulados para melhoria da estabilidade. A viscosidade da k-carragena influenciou em partículas maiores levando uma dissolução completa e resultou em maiores temperatura 50 e 90 °C. O aumento da liberação de α -amilase nas partículas de k-carragena, em baixas concentrações, pode ser explicado devido a baixa concentração de cloreto de potássio, ocasionando por sua estrutura menos reticulada resultando numa matriz mais porosa. A concentração de k- carragena (56,77%) teve coeficiente positivo, enquanto a concentração de cloreto de potássio e tempo de endurecimento foram negativos. Neste trabalho, ele conclui que o método de gelificação ionotrópica com matriz polimérica por 3,5%(p/v) k-carragena, 0,7M cloreto de potássio e 30 min de tempo de endurecimento resulta na produção de cordões com ausência de agregado, % de aprisionamento de 73,79 e T90 de 74,4 min e índice composto 83,01, portanto, a vida útil dos grânulos carregados de enzima aumentou até 3,53 anos em comparação com 0,99 ano da formulação convencional e melhora a estabilidade.

Segundo Wong, Tamb e Lau (1998), ao proporem um estudo de efeito da imobilização na microalga *Chlorella vulgaris* por meio da imobilização em gel de Carragenina. Neste estudo foi possível notar que o gel de Carragenina não teve efeitos adversos sobre o crescimento e fisiologia da microalga imobilizada e que a atividade da enzima foi conservada através das células imobilizadas, portanto, pode-se afirmar que a Carragenina pode ser utilizada com matriz de gel alternativa para imobilizar microalgas.

2.7. LEVEDURA DA ESPÉCIE *Saccharomyces pastorianus*

A levedura *Saccharomyces pastorianus* (antiga *Saccharomyces carlsbergensis*) (Nome comercial SAFLAGER™ S-23) por meio de diversos estudos constatou que não é uma linhagem pura, mais sim, híbrida entre a *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*. Esse autor considerou ainda que essa levedura teria um perfil fermentativo mais neutro e com maior capacidade de floculação e além de ser uma das mais utilizadas na indústria alimentícia para produção de bebida juntamente com a *Saccharomyces cerevisiae* (MATOS, 2021).

A *Saccharomyces pastorianus* foi descoberta em meados do século XIX, causando uma grande movimentação no mundo cervejeiro, sendo responsável pela fermentação de cervejas da família *lager*, sendo a espécie mais utilizada mundialmente no setor cervejeiro, sendo capaz de fazer fermentação em baixas temperaturas (GIBSON, B.R. & LITI, G., 2015).

2.8. LEVEDURA DA ESPÉCIE *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o primeiro eucarioto com genoma sequenciado utilizando como modelo em diversas pesquisas e considerada o maior produtor de produtos biotecnológicos do mundo, comparado a outro microrganismo, presente na produção de pães, pizzas, queijos, cervejas, vinhos e outros fermentados. Sendo, um fungo unicelular, heterotrófico e facultativo, sendo encontrado no ar, água e solo, possuindo características: pouco exigente ao meio de cultura (suportando meios ácidos e altas concentrações de açúcar), simplificação na manipulação genética, possibilitando geração e análise de mutantes, e entre outras (CRUZ, 2021).

2.9. VIABILIDADE DO MICRORGANISMOS

A viabilidade dos microrganismos estuda se os microrganismos são eficientes para determinado processo/tratamento e também, se podem ser utilizados mais de uma vez. Ultimamente tem-se estudo bastante a viabilidade dos microrganismos para ver se serão eficazes ou não. Com isso, alguns fatores são levados em consideração, tais como pH, acidez, oxigênio, atividade de água, sal, açúcar e produtos químicos e também, existem algumas que

podem atrapalhar condições de processamento, aromatizantes, corantes, entre outros (BIASUZ, 2021).

Um método muito utilizado para descoloração para viabilidade dos microrganismos é a coloração de azul de metileno, ocorrendo uma redução de sua coloração a partir das enzimas existentes, das enzimas existentes, com isso, quando as células estão mortas elas não coram, já as células vivas elas descolorem, com isso, pode-se realizar a estimativa da viabilidade celular (REVISTA INTERNET TÉCNICA DO VINHO, 2022).

E um método muito utilizado para determinar a viabilidade de células de leveduras é o uso da câmara de Neubauer, conhecida como hemacitometro. Onde a mesma, possui uma lâmina de microscopia com marcações quadrantes. Quando colocado no microscópio pode-se perceber que existem três tipos de quadrantes (A, B e C) formando um quadrado maior com subdivisões diferentes possuindo 9 quadrantes de 9 mm² sendo cada quadrante são quadrados 1x1 mm, em que no quadrante A, podem sendo contadas células grandes; quadrante B, podem ser contadas células intermediárias e o quadrante C, podem ser contadas células pequenas (UNESP, 2022).

2.8.MEIO SINTÉTICO DE CULTURA

O meio de cultura sintético pode ser utilizado para o desenvolvimento e crescimento de micro-organismos específicos, suprimindo assim, as exigências nutritivas dos microrganismos. E segundo Santos (2008), esse tipo de meio ao ser constituído por uma rica composição em nutrientes (açúcar, vitaminas e micronutrientes) fora do seu habitat natural e condições ambientais favoráveis para esse cultivo. Além desses fatores, deve ser levado em conta o pH e a quantidade de oxigênio ou mesmo a sua ausência (SANTOS, 2008).

2.8.1. Açúcar cristal

O açúcar cristal possui grãos maiores e transparentes, possuindo baixo teor de sólidos solúveis, além disso perde 90% dos seus sais minerais devido seu processo de refinamento, sendo muito utilizado na indústria alimentícia para produção de biscoitos, confeitos e bebidas (SANTOS, 2019).

2.8.2. Açúcar mascavo

O açúcar mascavo é um produto obtido da cana-de-açúcar da espécie *Saccharum officinarum* L., considerado escuro e úmido, ricos em sais minerais não sofrendo refinamento, conservando sua composição. Essa pode variar desde sacarose, frutose, glicose, potássio, cálcio, magnésio, fósforo, sódio, ferro, manganês, zinco, vitaminas A, B1, B12, B5, C, D6. Sua coloração irá depender de onde foi plantada e o clima da região, podendo trazer um caldo mais rico em polifenóis e aminoácidos e também da constituição do material utilizado no seu processamento, sendo melhor de aço inoxidável, sendo um produto ocorrendo um produto de coloração mais escura, ocorrendo o escurecimento do açúcar (LOTUMOLO, 2022).

2.8.3. Sacarose

A D(+)-sacarose P.A. composta por uma glicose e frutose, considerada um dissacarídeo. Somente a cana-de-açúcar e a beterraba podem produzir um rendimento viável para produção industrial desses compostos (SANTOS, 2019).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios (01/02 e 03/04) do Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal de São João Del-Rei, no Campus Alto Paraopeba, em Ouro Branco-MG.

3.1. FORMAÇÃO DAS ESFERAS

Utilizou-se a metodologia de Sankalia (2006) com modificações, para chegar aos parâmetros de temperatura da água para solubilizar a carragena, de 70°C. Para formar as esferas, a temperatura da solução de carragena deve abaixar até 55°C.

Foi realizado um estudo para conseguir as concentrações ideais da solução de k-carragena (*Cereais Bramil Ltda*) e da solução de KCl (*Dinâmica*). É na solução de KCl que ocorre a formação do gel agregado, devido a compensação de carga dos grupos sulfetos da carragena pelo íon K^+ . Além disso, é nessa fase que se consolida a conformação esférica do gel agregado.

Foram testadas diversas concentrações, tanto das soluções de carragena, quanto das soluções do cloreto de potássio. As massas utilizadas em todos os testes são apresentadas no Apêndice 1.

3.2. IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS

A quantidade de *Saccharomyces pastorianus* ou de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada para os experimentos de imobilização foi calculada por meio das taxas de inoculação (mínima: 80 g.L⁻¹ e máxima: 120 g.L⁻¹) indicadas pelo fabricante, considerando-se uma correção, devido não ser esperado a multiplicação considerável de células durante o processo de fermentação em meio sintético previamente não aerado.

Assim, foi possível definir as taxas de leveduras liofilizadas (mínima: 0,30 g e máxima: 0,45g) para fermentação do volume de 150 ml de substrato. Para a hidratação das leveduras, foi utilizado 10 vezes a sua massa. A Tabela 5 apresenta a massas de água.

Tabela 5. Concentrações de leveduras para os testes de fermentação.

Experimento	Taxa de inoculação de leveduras (g/150 ml)	Massa de água destilada	Concentração da solução de carragena (g.L⁻¹)
1	0,30	3	10
2	0,45	4,5	10

Pesou-se 0,30 e 0,45 g de leveduras *Saccharomyces pastorianus* e *Saccharomyces cerevisiae* e hidratadas com 3,0 e 4,5 g de água destilada respectivamente, respeitando a indicação do fabricante, ficando 30 min submersas até a completa hidratação dessas leveduras.

As soluções de carragena de concentração 10 g.L⁻¹ foram preparadas a partir da utilização de 1 L de água destilada previamente aquecida a 70 °C. Após o aquecimento foram adicionadas as massas de carragena para o preparo da solução e houve a agitação das mesmas. Em seguida, realizou-se o resfriamento até atingir a 40-45°C para acrescentar a levedura *Saccharomyces pastorianus* e *Saccharomyces cerevisiae*. As soluções ficaram em agitação constante para completa homogeneização e, em seguida, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, a solução foi gotejada na solução de KCl. As esferas ficaram 30 min na solução de cloreto de potássio.

3.3. MEIOS DE CULTURA SINTÉTICO

Na Tabela 6 estão listadas as massas dos componentes utilizados na preparação do meio de cultura sintético.

Tabela 6. Composição do meio de cultura sintético

Composto	Massa (g)
Água Destilada	300
Açúcar (Mascavo ou Cristal ou Sacarose)	42
Extrato de levedura	1,5
Sulfato de Magnésio (MgSO₄)	0,21
Cloreto de Amônio (NH₄Cl)	0,36

Os compostos foram homogeneizados por meio da fervura durante 10 min utilizando um agitador magnético com Erlenmeyer de 500 ml. As soluções ficaram vedadas para o atingir a temperatura de 26 °C, resfriando naturalmente. Em seguida, transferiu-se 150 mL do meio fervido para 2 Erlenmeyers de 250 ml e acrescentou-se a as esferas imobilizadas com a levedura, ou as esferas sem leveduras, ou ainda as leveduras não imobilizadas.

A concentração inicial de sólidos solúveis do meio de cultura a 40°C foi mensurada em 12°Brix, com a utilização de um refratômetro (*INSTRUTHERM*) previamente calibrado com água destilada.

3.4. FERMENTAÇÃO

Os experimentos de fermentação para verificar a atividade das leveduras imobilizadas nas esferas de carragena foram realizados utilizando como substrato o açúcar mascavo (*Viver Bem*), açúcar cristal (*Cristal de Minas*) e a D(+)sacarose P.A. (*Êxodo Científica*). Os experimentos foram realizados em triplicata, conforme descrito a seguir:

- 1ª Experimento: esferas carragena (sem leveduras);
- 2ª Experimento: levedura de maior concentração (0,45g) não imobilizada;
- 3ª Experimento: levedura de menor concentração (0,30g) não imobilizada;
- 4ª Experimento: esferas de carragena contendo as leveduras na maior concentração (0,45g);
- 5ª Experimento: esferas de carragena contendo as leveduras na menor concentração (0,30 g).

Durante o período entre 8-9 dias, as amostras que continham o açúcar cristal ou o açúcar mascavo no substrato, ficaram no *shaker*; as amostras que utilizaram sacarose como substrato, ficaram 10 dias no *shaker*. A concentração de sólidos solúveis foi aferida diariamente, com o auxílio de um refratômetro.

Inicialmente, realizou-se a medição dos sólidos solúveis da carragena com água destilada, demonstrando 1°Brix. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5. SECAGEM DAS ESFERAS DE CARRAGENA

A secagem das esferas de carragena sintetizadas foram realizadas de três formas diferentes:

- Na estufa com circulação de ar, à 35°C;
- No dessecador, à temperatura ambiente;
- Naturalmente, em um recipiente aberto, à temperatura ambiente.

Primeiramente, realizou-se a produção das esferas de carragena com a inoculação do *Saccharomyces cerevisiae* (0,45 g). 5 g de cada amostra foram colocadas em placas de Petri e aguardou a secagem. Posteriormente, realizou-se a reidratação das esferas com 15 ml de água.

3.6. VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS

A viabilidade das leveduras foi calculada com intuito de verifica se os processos de síntese das esferas e de fermentação causaram prejuízos aos microrganismos. Para isso, foram calculadas as viabilidades tanto da *Saccharomyces pastorianus*, quanto da *Saccharomyces cerevisiae* nas seguintes condições:

- 1) *in natura* (antes de qualquer processamento);
- 2) após o processo de imobilização na esfera de carragena;
- 3) após os 10 dias de uso e mais 10 dias de reuso;
- 4) após a desidratação e reidratação no dessecador;

Para liberar as leveduras imobilizadas nas esferas de carragena, realizou o seguinte procedimento: foram pesadas 5 g das esferas e adicionadas em um béquer com 50 ml de água destilada, em seguida colocou-se no agitador magnético com aquecimento (40-45°C) para dissolver das esferas de carragena e dispersar das leveduras na água.

Em seguida, realizou-se a coloração das leveduras com uma solução de azul de metileno. A solução de azul de metileno foi preparada com 1 g de azul de metileno e 2 g de citrato de sódio, dissolvidos em 10 ml de água destilada. A solução foi agitada até a dissolução completa. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel filtro e adicionado, ao filtrado, 100 ml de água destilada. Iguais volumes, de 100 µL, de amostra e da solução corante foram colocados em Eppendorfs e agitados. Alguns da µL mistura foram colocados na câmara de

Neubauer e levados ao microscópio com aumento de 40x, para contagem de células de levedura.

Posteriormente, para realizar a contagem dos microrganismos utilizou-se o microscópio e realizou-se a contagem das células de leveduras através da câmara de Neubauer, para verificar a viabilidade dos microrganismos, onde as células vivas ficavam transparentes e as células mortas apresentavam-se coloridas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. FORMAÇÃO DAS ESFERAS DE CARRAGENA

Foram testadas diversas concentrações, tanto das soluções de carragena, quanto das soluções do cloreto de potássio, para se alcançar a agregação eficiente do gel de carragena na solução de KCl. Em diversas concentrações das soluções não se evidenciava a formação do gel de carragena na solução de KCl, pois o gel se solubilizava completamente.

Segundo Canilla e colaboradores (2006), o cloreto de potássio aumenta a firmeza do gel, a temperatura de gelificação e a temperatura de fusão do gel. As concentrações que formaram as melhores esferas, devido tanto à formação do gel, quanto do formato esférico e da textura da partícula, foram as seguintes:

- A solução de carragena de concentração 10 g.L^{-1} ;
- A solução de KCl na concentração de $0,848 \text{ mol. L}^{-1}$.

A solução de carragena foi preparada a partir da utilização de 100 ml de água destilada previamente aquecida a 70°C . Após o aquecimento foram adicionadas a massa de 1g k-carragena para o preparo da solução. A solução ficou em agitação constante para completa homogeneização e formação do gel de carragena. Posteriormente, a solução foi resfriada até 55°C , pois essa temperatura foi considerada adequado para o gotejamento. O gel foi mantido em agitação até o término do gotejamento.

A solução de cloreto de potássio de $0,848 \text{ mol. L}^{-1}$ foi preparada da seguinte forma: foi pesada 2,53 g cloreto de potássio e solubilizado em 40 ml de água destilada, à temperatura ambiente. O gotejamento foi realizado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Para o gel ficar no formato esférico, a solução de carragena foi gotejada bem próxima à superfície da solução de KCl. Em seguida, as esferas permaneceram 30 min na solução de KCl. A Figura 3 apresenta as fotos das esferas de carragena sintetizadas com as melhores concentrações das soluções de carragena e de KCl.

Figura 3. Esferas de carragena sintetizadas com as melhores concentrações das soluções de carragena e de KCl (Autora, 2022).



4.2. ATIVIDADE NA FERMENTAÇÃO

4.2.1. Açúcar mascavo

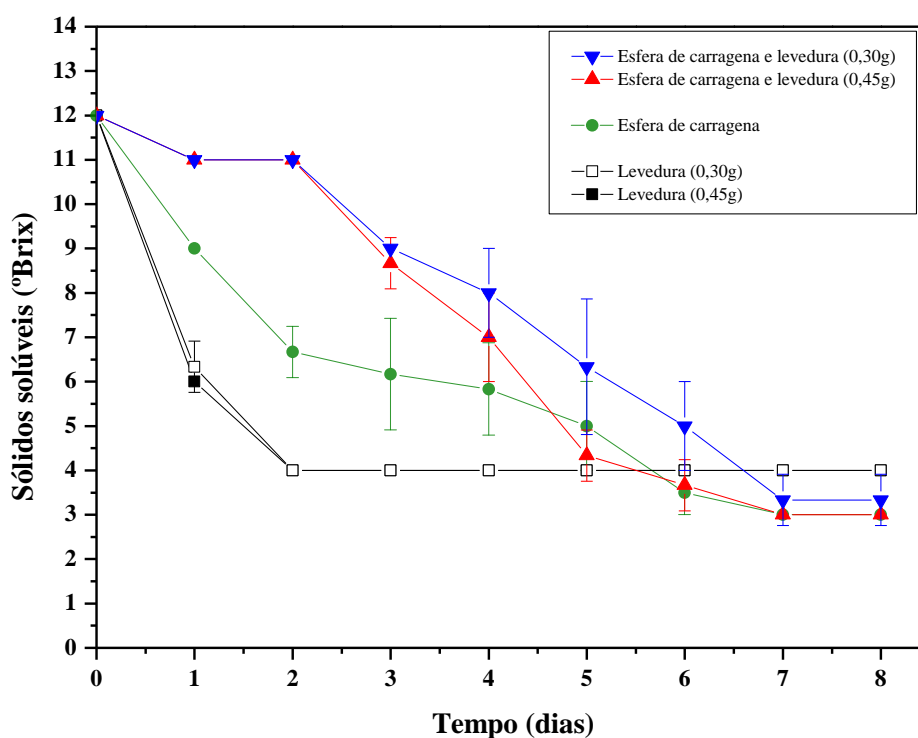
A Figura 4 apresenta os resultados da fermentação utilizando a *Saccharomyces pastorianus* e como substrato, o açúcar mascavo.

Pela Figura 4 é possível verificar que houve um consumo do açúcar em todos os experimentos propostos. Entretanto, foram observados diferentes perfis de consumos em relação às leveduras livres, às leveduras imobilizadas e as esferas de carragena.

Nos Experimentos que utilizavam as leveduras livres (sem imobilização na carragena), observou-se que houve um consumo mais rápido do açúcar em relação aos demais experimentos, ficando estável a partir do segundo dia. O açúcar serviu de alimento para as leveduras, fazendo-as multiplicarem-se, servindo posteriormente como fonte de energia e carbono (LIMA, 2017). No experimento contendo apenas esferas de carragena, pode-se observar que ocorreu alto consumo do açúcar mascavo, mostrando que a carragena

absorveu o açúcar, possivelmente devido ao aumento das forças de interação eletrostática, que assim, a função gelificante, conforme explicado por Argagel (2022).

Figura 4. Experimentos realizados com a *Saccharomyces pastorianus* e o açúcar mascavo, com a temperaturas média de 29 °C.



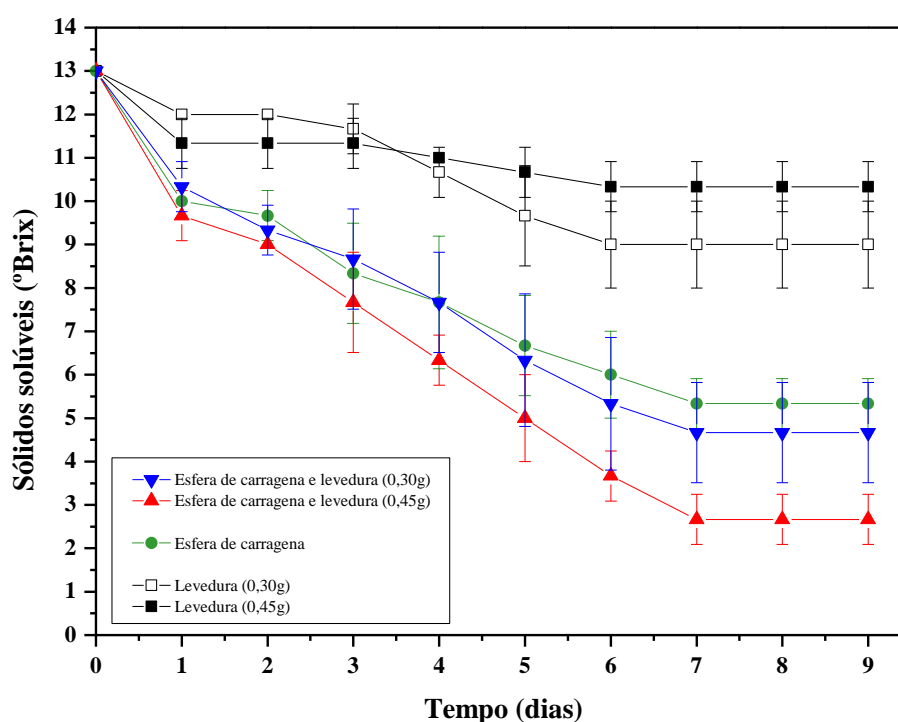
Nos Experimentos que continham a imobilização das esferas de carragena (0,30 e 0,45 g), pode-se notar que a velocidade de consumo foi um pouco mais lenta, devido, provavelmente, a problemas de difusão do açúcar, primeiramente pela rede polimérica da carragena e posteriormente pelo consumo das leveduras. Ou seja, provavelmente ocorre uma competição entre a levedura e a carragena, devido a levedura consumir o açúcar dentro da rede polimérica da carragena.

Mesmo ocorrendo uma menor velocidade de consumo do açúcar pelo microrganismo imobilizado, ao final de 7-8 dias, os consumos ficaram praticamente na mesma faixa.

4.2.2. Açúcar cristal

A Figura 5 apresenta os resultados da fermentação utilizando a *Saccharomyces pastorianus* e como substrato, o açúcar cristal.

Figura 5. Experimentos realizado com a *Saccharomyces pastorianus* e o açúcar cristal, com a temperaturas média de 29 °C.



Pela Figura 5 observa-se que os experimentos que utilizavam as leveduras livres (sem imobilização na carragena), obtiveram pouco consumo quando comparado com o consumo do açúcar mascavo. As diferenças, possivelmente, podem ser explicadas devido o açúcar cristal ter passado mais processos químicos, e com isso, ocorrer uma diminuição da quantidade de nutrientes disponíveis e, possivelmente o aumento de algumas substâncias que inibem o metabolismo das leveduras. Assim, a levedura não consome totalmente o açúcar presente, podendo ser explicado por Lima (2017), devido às leveduras precisarem de nutrientes para multiplicar e sobreviver ao meio.

É possível observar que no experimento que continha apenas as esferas de carragena, houve um alto consumo do açúcar (7 °Brix, entre 7-9 dias), mostrando que a carragena para adequar-se ao meio ela consome tudo que está no seu redor para poder se fortalecer (Adamante; Minosso, 2012).

Em relação aos experimentos a imobilização das esferas de carragena (0,3 e 0,45 g), demonstraram uma certa similaridade, podendo ser explicado que a carragena juntamente com a levedura possuem uma interação com sais, polissacarídeos e proteínas, consumindo o açúcar com um todo (Aditivos & Ingredientes, 2020) e se beneficiando com sua fortificação da sua função gelificante. Portanto, o perfil de consumo pode ser o resultado tanto da adsorção do açúcar pela matriz polimérica da carragena, quanto pelo metabolismo das leveduras. Uma evidência que as leveduras estavam consumindo o açúcar, e, conseqüentemente, produzindo dióxido de carbono, isso pode ser observado, pois a medida que a fermentação se processava a densidade das esferas diminuía, sendo que as esferas inicialmente no fundo do Erlenmeyer começaram a flutuar.

Como mostrado, o estudo de Lau *et. al.*, (1998), em que demonstraram evidências de que o gel de carragena não teve efeitos adversos sobre o crescimento e fisiologia do imobilizado microalga. A atividade enzimática, também foi conservada nas células imobilizadas. A carragena poderia, assim, ser uma matriz de gel alternativa para imobilizar microalgas, mostrando-se eficiente para a realização do estudo.

Realizando uma análise sobre o consumo de açúcar mascavo e cristal, pode-se notar que teve o mesmo comportamento realizado por Calik e colaboradores (1999), Pramanik e colaboradores (2011), Sankalia (2005) e Lau *et. al.*, (1998) considerando-se eficaz para o estudo, devido os mesmos, terem comportamento parecido com os artigos descritos e chegou-se no objetivo almejado, em que as esferas de carragena consomem o açúcar do meio presente. Entretanto, posteriormente será apresentado o resultado da viabilidade celular para corroborar com esses resultados.

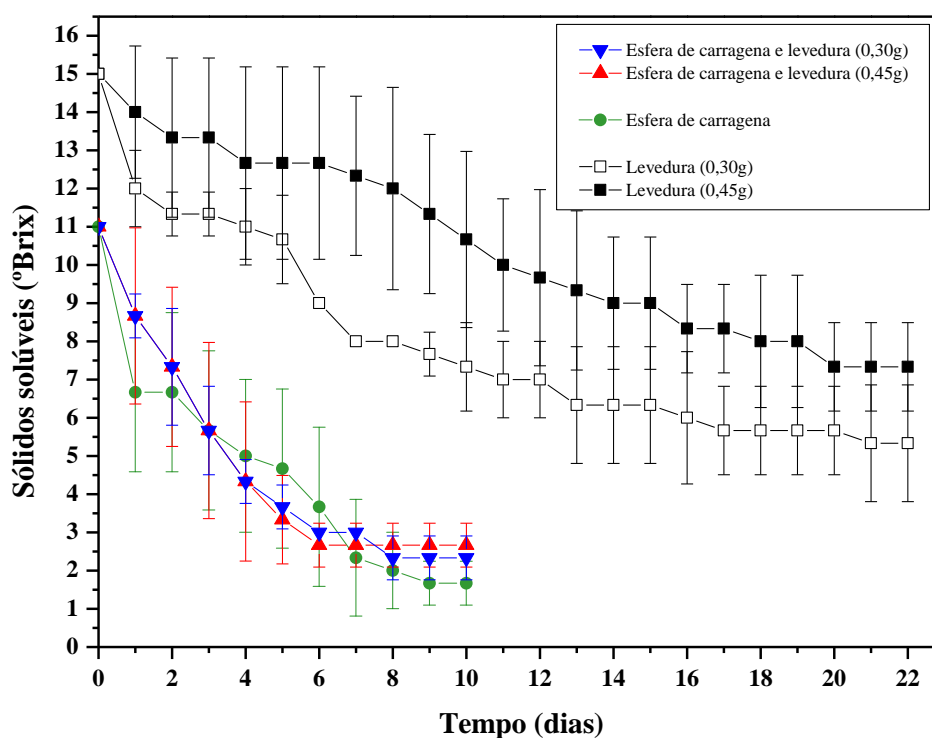
4.2.3. Sacarose

As Figura 6 e 7 apresentam os resultados da fermentação utilizando a *Saccharomyces pastorianus* e como substrato, a sacarose, sendo que na Figura 7 são apresentados os resultados do reuso das esferas de carragena.

Observa-se na Figura 6, que houve um consumo de todos os experimentos de forma satisfatória e um pouco mais rápida um consumo dos açúcares em todos os experimentos de forma satisfatória, sendo um pouco mais rápido ao se comparar aquele que ocorreu de açúcar

crystal ao mascavo, as esferas de carragena e a imobilização de leveduras(0,30 e 0,45 g) nas esferas de carragena. comparada ao açúcar cristal e mascavo, as esferas de carragena e a imobilização das leveduras (0,30 e 0,45 g) nas esferas de carragena. Sendo explicado devido a D(+)-sacarose PA ser uma molécula polar e também seu transporte ocorrer através de membranas a favor do gradiente de concentração (difusão facilitada). E outra questão que pode estar associada, seria o fato de que a carragena kappa é solúvel em soluções de sacarose até 65% após o aquecimento a 70°C (SANTOS, 2019).

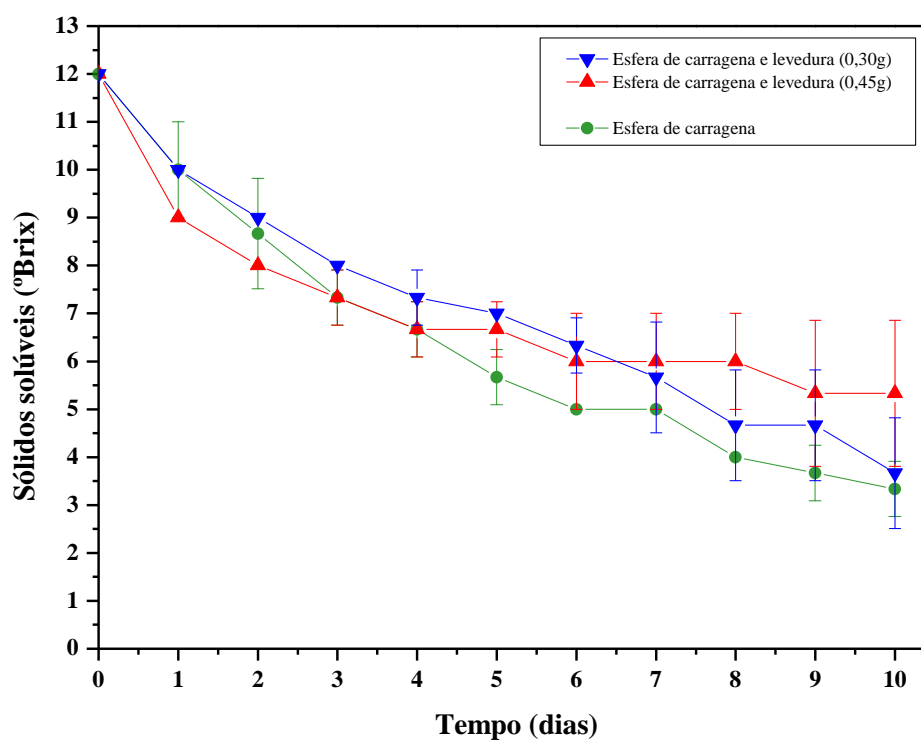
Figura 6. Experimentos realizado com a *Saccharomyces pastorianus* e a sacarose, com a com temperatura média de 29 °C.



Na Figura 7, que apresenta o reuso das esferas de carragena, pode-se observar que houve um consumo bom por se tratar de um reuso, mostrando que é possível utilizar mais de uma vez a imobilização das esferas de carragena com *Saccharomyces pastorianus*. Como demonstrado por Canilha e colaboradores (2007) e Ariyajaroenwong e colaboradores (2012), quando utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* imobilizados em esfera de Loog-pang (levedura chinesa para produção de vinho de arroz tailandês), os resultados mostraram que uma boa escolha do material (suporte e microrganismos) escolhido para imobilização das

células. Isso pode ser explicado segundo seus autores pela alta resistência mecânica, assim permitindo sua reutilização em repetidos ciclos de fermentação.

Figura 7. Experimentos de reuso realizado com a *Saccharomyces pastorianus* e a sacarose, com a com temperatura média de 29 °C.



As Figura 8 e 9 apresentam os resultados da fermentação utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* e como substrato, a sacarose, sendo que na Figura 9 são apresentados os resultados do reuso das esferas de carragena.

Nas Figura 8 e 9, quando utilizada a *Saccharomyces cerevisiae*, observou-se que houvesse um equilíbrio de consumo entre todas as amostras demonstrando que a D(+) sacarose é eficaz no meio de cultura para fornecer nutrientes, demonstrando a rapidez do consumo e absorção das esferas de carragena e levedura (0,30 e 0.45 g) e as esferas de carragena. De acordo com Souza (2017), o reuso é considerado uma das grandes vantagens da imobilização de células quando escolhidos suportes inertes e que apresentam alta resistência mecânica, podendo ser usados por longos períodos.

Figura 8. Experimentos realizado com a *Saccharomyces cerevisiae* e a sacarose, com a com temperatura média de 29 °C.

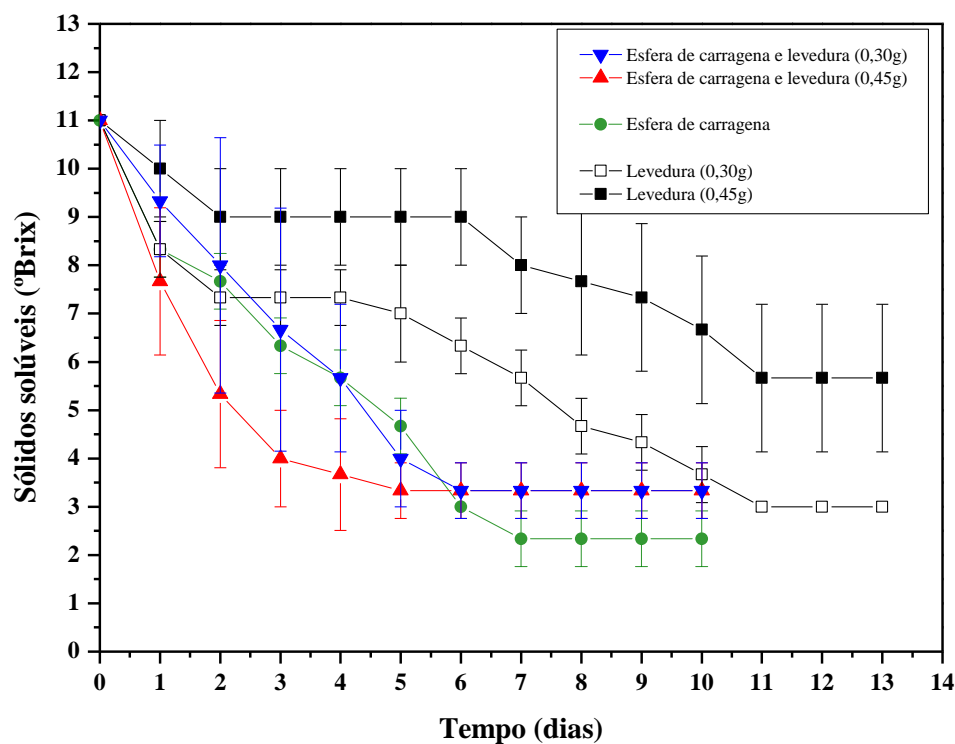
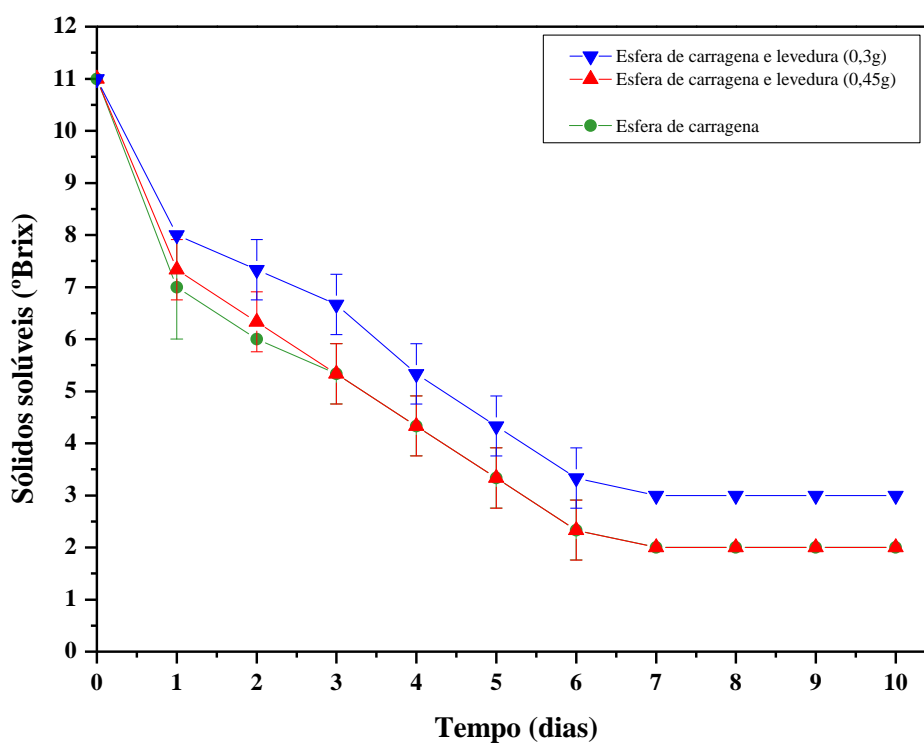


Figura 9. Experimentos de reuso realizado com a *Saccharomyces cerevisiae* e a sacarose, com a com temperatura média de 29 °C.



Na Figura 9, foi realizado o reuso da amostra anterior para ver seu comportamento. Notou-se que houve consumo mais rápido no reuso, dando indícios que o meio sintético está fornecendo nutrientes para as leveduras desenvolverem, fazendo assim, sua multiplicação, em seguida, servindo como fonte de energia e carbono para demais etapas e também, para formação do CO₂ e do álcool (LIMA, 2017). Em relação as leveduras, pode-se notar que ocorre um consumo mais lento das leveduras (0,3 g) comparado a levedura (0,45 g) ocorrendo um decaimento acelerado, porém elas estabilizam no final.

4.3. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS

A Tabela 7 apresenta o consumo percentual do °Brix, calculado a partir da diferença entre o início e o término dos experimentos.

Tabela 7. Porcentagens (%) de consumo de substrato (°Brix) ao final dos experimentos.

	Sacarose		Sacarose		Açúcar Mascavo	Açúcar Cristal
	<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. pastorianus</i>		<i>S. pastorianus</i>	<i>S. pastorianus</i>
	1º Uso	2º Uso	1º Uso	2º Uso		
Esfera de carragena com levedura (0,3g)	69,72 ^f	72,72 ^e	78,82 ^a	69,41 ^c	72,25 ^b	64,08 ^d
Esfera de carragena com levedura (0,45g)	69,72 ^f	81,81 ^e	75,72 ^b	55,58 ^d	69,41 ^c	79,46 ^a
Esfera de carragena	78,82 ^f	81,81 ^e	84,82 ^a	72,25 ^c	75,00 ^b	59,00 ^d
Levedura (0,3g)	72,72	-	64,47 ^b	-	66,67 ^a	30,80 ^c
Levedura (0,45g)	48,45	-	51,13 ^b	-	66,67 ^a	20,53 ^c

Letras (a,b,c,d,e,f) ilustra que os valores são estatisticamente diferentes.

Letras (a,b,c e d) ilustra que o Teste de Tukey feito para *S. pastorianus*.

Letras (e,f) ilustra que o Teste de Tukey feito para *S. cerevisiae*.

Nível de significância: 5%

O teste de Tukey foi realizado separadamente para *S. pastorianus* e *S. cerevisiae*. Com isso, para realizar a diferença significativa entre as amostras utilizou-se as letras: *S. pastorianus* (a,b,c,d) e *S. cerevisiae* (e,f). O teste de Tukey foi realizado para comparação entre dois microrganismos em diferentes métodos utilizados no trabalho.

Os experimentos realizados com esferas de carragena com levedura *S. pastorianus* (0,3g), por meio do teste de Tukey, foi possível analisar estatisticamente que utilizando o meio com sacarose é superior e diferente significativamente dos demais. Os experimentos

utilizando açúcar mascavo também difere dos demais e apresentou segundo melhor resultado. Entretanto, também pelo teste de Tukey, pode-se perceber que os experimentos diferem dos demais, onde utilizou-se o açúcar cristal, e apresentou uma porcentagem de consumo inferior aos demais.

Os experimentos realizados com as esferas de carragena com leveduras *S. pastorianus* (0,45g), através do teste de Tukey, sendo possível analisar estatisticamente que utilizando o meio com açúcar cristal é superior e diferente significativamente dos demais. Os experimentos utilizando a sacarose difere dos demais e apresentou segundo melhor resultado.

Os experimentos realizados com esferas de carragena que continham *S. pastorianus* por meio do Teste de Tukey, foi possível analisar estatisticamente que utilizando o meio com sacarose é superior e difere significativamente dos demais. Os experimentos utilizando açúcar cristal apresentou pior resultado entre os demais.

Os experimentos realizados com as leveduras *S. pastorianus* (0,3g) e (0,45g) por meio do Teste de Tukey, foi possível analisar estatisticamente que utilizando o açúcar mascavo é superior e difere significativamente dos demais. Porém, pelo teste de Tukey, pode-se perceber que os experimentos diferem dos demais onde utilizou-se o açúcar cristal apresentando-se uma porcentagem de consumo inferior aos demais.

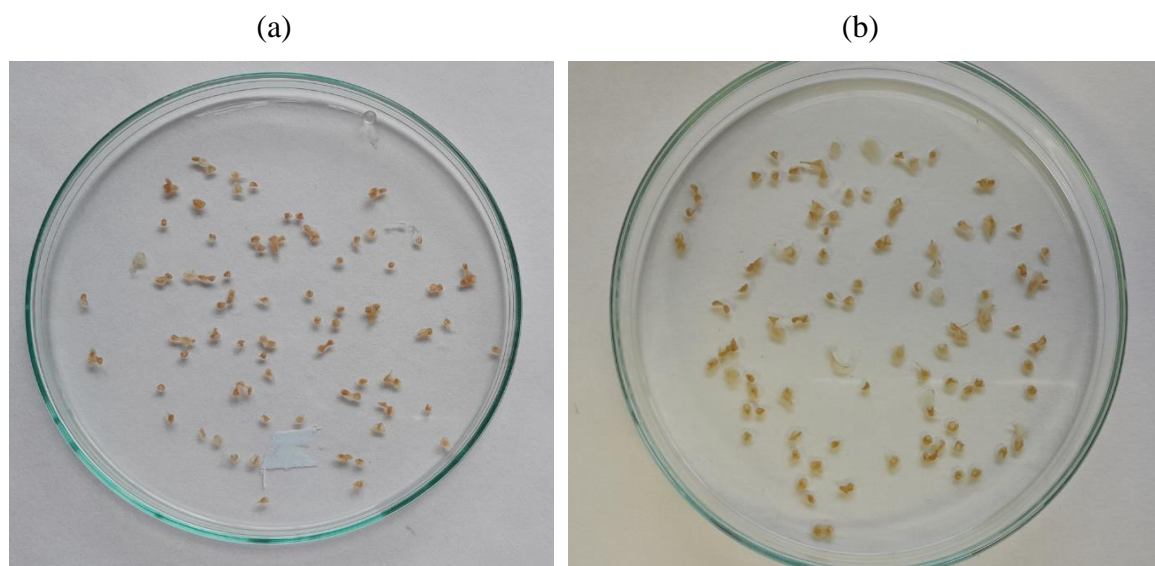
Os experimentos realizados com esferas de carragena e levedura *S. cerevisiae* (0,30 e 0,45) e apenas as esferas de carragena, através do teste de Tukey, foi possível analisar estatisticamente que utilizando o 2 reuso foi superior ao primeiro reuso.

Sendo explicado através de suas características físicas e biológicas distintas dos açúcares (mascavo, cristal e sacarose). O açúcar mascavo possui alto teor de umidade e impurezas devido as práticas na fabricação. Ressalta-se que o açúcar mascavo não possui fases de refinamento conservando seus componentes e não tem processo suficiente para remover as impurezas presentes no caldo. Realizando uma comparação entre o açúcar mascavo e o cristal, pode-se observar desde a elaboração, devido, o açúcar cristal ser obtido através de diversos processos químicos, destruindo quase todos os minerais presentes ,ou seja, o açúcar cristal possui menos sais minerais e um teor mais alto de sacarose comparado ao açúcar mascavo (JESUS, 2010). Por isso, observa-se uma porcentagem menor de consumo de substrato.

4.4. SECAGEM DAS ESFERAS

Observou-se que ambos métodos utilizados para secagem das esferas de carragena com leveduras imobilizadas foram eficientes. Na estufa à 35°C, as esferas de carragena demoraram 24 h para a secagem completa. No dessecador, à temperatura ambiente, as esferas levaram 48 h para secar. Já quando as esferas foram colocadas para secar naturalmente à temperatura ambiente, a secagem levou 72 h. A Figura 10 apresenta as fotos das esferas seca na estufa e no dessecador.

Figura 10. Fotos das esferas de carragena com levedura imobilizada após a secagem (a) no dessecador, por 48 horas; e (b) na estufa a 35°C, 24 h.



De acordo com Faria e Minosso (2012), a carragena do tipo Kappa possui excelentes agentes retentores de água, por possuírem alta capacidade de absorver água e formar géis, e também, a retenção da umidade natural, eliminando a perda de líquidos, prolongando a suculência do produto consequentemente, melhorando a textura do produto por meio da gelificação, beneficiando o fatiamento, textura e firmeza.

Em seguida, foi realizado a reidratação, demorando aproximadamente entre 7 a 10 min, mostrando-se eficaz. Visualmente pode-se notar que sua esfericidade prevaleceu. Sendo explicado devido seu alto poder de absorção de água (aproximadamente trinta vezes o seu peso) sua umidade natural, bastante utilizada em produtos cárneos (MINOSSO,2012).

4.5. VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS

A Tabela 8 apresenta as porcentagens para células viáveis em diferentes etapas dos experimentos.

Tabela 8. Porcentagens de células viáveis em diferentes etapas dos experimentos.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pastorianus</i>
<i>In natura</i>	65%	29,6%
Esferas recém sintetizadas	2,3%	3,6%
Após uso e reuso	23,5%	9,2%
Após a desidratação e reidratação das esferas	0	0

Através da Tabela 8, pode-se notar que o processo de síntese das esferas de carragena é muito prejudicial à viabilidade das leveduras. Possivelmente, a temperatura de 40-45°C utilizada para a formação das esferas de carragena foi prejudicial para as leveduras, além disso, a alta concentração de KCl, à qual são expostas as leveduras mais exteriores da esfera de carragena, ocasionado a sua morte devido à alta pressão osmótica. Assim, após a síntese, apenas 2,3% e 3,6% das células *Saccharomyces cerevisiae* e da *Saccharomyces pastorianus* foram viáveis, respectivamente.

Entretanto, durante a fermentação as concentrações de células viáveis aumentam para 23,5 % e 9,2% das células *Saccharomyces cerevisiae* e da *Saccharomyces pastorianus*, respectivamente. Tais resultados evidenciam que as células consumiram o substrato e se multiplicaram. Portanto, segundo Lima (2017), os nutrientes presentes no meio de cultura, que irão fortalecer os microrganismos, fazendo com que eles se multipliquem.

Já em relação *Saccharomyces pastorianus* observou-se que a porcentagem de leveduras *in natura* foi baixa (29,6%) e ao realizar a imobilização essa porcentagem diminuiu (3,6%) e quando utilizada e reutilizada aumentou, porém em menor quantidade comparada com a *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando que pode ter acontecido algo no processo de conservação das leveduras.

As células tanto da *Saccharomyces pastorianus* quanto da *Saccharomyces cerevisiae* não resistiram ao processo de desidratação e reidratação das esferas, mostrando que o

dessecador não é um bom método para realizar a secagem. Possivelmente, o método de liofilização seja o mais adequado para realizar a desidratação dos microrganismos imobilizados na esfera de carragena.

5. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos nas condições experimentais, pode-se concluir que houve uma melhor combinação de concentrações de soluções para formação das esferas de carragena. A solução de carragena de concentração 10 g.L^{-1} e a solução de KCl na concentração de $0,848 \text{ mol. L}^{-1}$.

Ambos os microrganismos utilizados *Saccharomyces pastorianus* e *Saccharomyces cerevisiae* obtiveram resultados eficientes com as esferas de carragena, mostrando que qualquer um dos dois utilizados irão ter resultados eficazes.

Em relação aos três açúcares utilizados no meio sintético pode-se notar que todos obtiveram resultados bons, porém a sacarose se sobressai em relação ao demais, porque juntamente com as esferas de carragena consumiram mais rapidamente do açúcar do meio sintético.

Os três métodos utilizados na secagem foram eficientes para secar as esferas de carragena, porém realizando a contagem de células viáveis, após o processo de reidratação, verificou-se que era nula a viabilidade das leveduras.

Realizando uma comparação entre a porcentagem de consumo pode-se perceber que para *S. pastorianus*: nas esferas de carragena com levedura (0,3 g), o melhor açúcar utilizar é a sacarose; nas esferas de carragena com levedura (0,45 g), o melhor açúcar utilizar é o açúcar cristal; as esferas de carragena é a sacarose; as leveduras (0,3g e 0,45), o melhor açúcar utilizar é o açúcar mascavo.

Apesar desses desafios, o uso das esferas de carragena com leveduras imobilizadas pode ser considerado uma estratégia interessante para a fermentação alcoólica, pois permite a utilização de células imobilizadas, que podem ser reutilizadas, além de possibilitar uma melhor eficiência na fermentação. Em vista de tudo isso pode-se concluir que células de microrganismos podem ser imobilizadas em esferas de carragena, entretanto, deve-se refinar o processo de imobilização para aumentar a viabilidade celular. Além disso, as células imobilizadas podem ser usadas e reutilizadas em processos biotecnológicos para produção de produtos de interesse.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para futuros trabalhos que viam a utilização da imobilização de microrganismos em esferas de carragena, seguem algumas sugestões:

- Aplicação em processos biotecnológicos (produção de cerveja, fertilizantes, entre outros);
- Testar em outros microrganismos, que sejam mais resistentes à temperatura do processo de síntese das esferas;
- Realizar diariamente a contagem de leveduras;
- Testar outros métodos de secagem que consigam preservar a viabilidade dos microrganismos, como por exemplo, a liofilização;
- Testar o número máximo de reuso dos microrganismos imobilizados;
- Testar fermentação realizada no biorreator.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMANTE, J. MINOSSO, N. **Avaliação da viscosidade de carragenas comerciais.** Trabalho de conclusão de curso, apresentado como requisito parcial para a obtenção do Grau de Tecnólogo, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira, 2012.
- ADITIVOS & INGREDIENTES. **Carragenas: Kappa, Iota, Lambda, Um, Nu e Theta.** Disponível em: <https://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201602/2016020229627001454324315.pdf>. Acesso em 29 de set 2020.
- AGARGEL – **Carragena.** Disponível em < <http://www.agargel.com.br/carragena.html>>. Acesso em 14 de jun de 2022.
- ALMEIDA, B.K.C., SILVEIRA, C.C., CARNEIRO, F.M. **O uso de algas em cosméticos: um estudo cienciométrico.** Journal of Biology & Pharmacy Agricultural Management, v. 16, n. 1, 2020.
- ANTUNES, A. J.; CANHOS, V. P., **Aditivos em alimentos.** São Paulo: FTPT, 1984.
- ARIYAJAROENWONG, P.; LAOPAIBOON, P.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, L. **Repeated batch ethanol production from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae* on sweet stalks.** Energies, v. 5, p. 1215-1228, 2012.
- BASILIO, T.H. **Biodiversidade e conservação das ilhas costeiras do litoral sul capixaba.** Lura Editorial, São Paulo, 2020.
- BASSANI, J. C. **Imobilização de células microbianas em esferas de alginato de cálcio e avaliação da viabilidade celular e estabilidade bioquímica em diferentes condições de armazenamento.** Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, do Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Química de Alimentos, 2018.
- BIASUZ, T. **Obtenção de espécies de *Lactobacillus* microencapsulado em carragena com combinação proteica e aplicação em salame tipo milano.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná– UTFPR, Câmpus Medianeira/Campo Mourão, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos, 2018.
- ÇAHK, G.; SAVASÇI, H.; ÇAHK, P.; OZDAMAR, T.H., **Growth and carrageenan immobilization of *Pseudomonas dacunhae* cells for L-alanine production.** Enzyme and Microbial Technology, v.24, p.67-74, 1999.

- CALIK, G; SAVADCI, H; CALIK, P; OZDAMAR, T.H., **Growth and k-carrageenan immobilization of *Pseudomonas dacunhae* cells for L-alanine production.** Department of Chemical Engineering, 06100 Tandog'an, Ankara, Turkey Received 20 August 1997; revised 1 June 1998; accepted 24 June 1998.
- CANILLA, L., CARVALO, W. SILVA, J. B. A., **Biocatalizadores imobilizados. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento ano IX - nº 36 - janeiro/junho, 2006.
- COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C; GOMES, E; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R., **Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas.** Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, jul./dez. 2007.
- CRUZ, H. R., **Avaliação da relação C/N no desempenho da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1.** Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola. USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2021.
- DALPONTE, I.; MATHIAS, A. L; JORGE, R.M. M.; WEINSCHUTZ, R., **Degradação fotocatalítica de tartrazina com TiO₂ imobilizado em esferas de alginato.** Química Nova, Vol. 39, No. 10, 1165-1169, 2016.
- DUARTE, D. M., **Estudo da esterificação e tecnologia de produção de esferas de alginato/pectina, de grandes dimensões com o centro líquido.** Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Empreendedorismo e Inovação na Indústria Alimentar do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, 2015.
- FARIA, G. S. M., **Influência do processo de secagem convectiva na qualidade da carragenana extraída de *Kappaphycus alvarezii*.** Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, 2012.
- FERREIRA, V. L. P.; SOLER, M. P., **Curso sobre as propriedades de hidrocolóides e aplicações.** Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos. vol.3, 1992
- GELYMAR, **Carrageenan Properties.** Disponível em: <www.gelymar.com>. Acesso em: 20 abril 2020.
- GIBSON, B.R.; LITI, G., ***Saccharomyces pastorianus*: genomics insights inspiring innovation for industry.** Yeast, 32, 17-27, 2015.
- GIESE, E. C.. **Potencial biotecnológico do uso de micro-organismos imobilizados em gel de alginato de cálcio.** Rio de Janeiro: Cetem/mcti, 47 p., 2015.
- GOES, H. G. D., **Monitoramento da produção e do rendimento de carragena da microalga exótica *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex. P. C. Silva e avaliação de técnica de produção, em cultivo comercial na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. 2009.69.** Dissertação de Mestrado Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro.

- GOMES, R.V., **Imobilização de esporos *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão par uso na biodegradação de hidrocarbonetos**. Dissertação de Pós Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito pela obtenção do grau de mestre. Fortaleza, 2007.
- GONDIM, D. R., **Produção de bioetanol utilizando células imobilizadas em bagaço de caju**. 2009. 31 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009. Disponível em: <http://www.eq.ufc.br/TFC/TFC_2009_Gondim.pdf>. Acesso em: 17 de jun de 2020.
- GROBOILLOT, A.; BOADI, D. K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J., **Immobilization of cells for application in the food industry**. Critical Reviews in Biotechnology. v.14, p.75-107, 1994.
- JESU, D. A. **Qualidade microbiológica de amostras de açúcar mascavo**. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos Piracicaba, 2010.
- JESUS, G. C., **Desenvolvimento de matrizes poliméricas de alginato e pectina para o cultivo de células imobilizadas de *Desmodemus subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal e Bioprocessos associados. UFSCAR, Araras, 2018.
- KAREL, S.F.; LIBICKI, S.B.; ROBERTSON, C.R. **The immobilization of whole cells: Engineering principles**. Chemical Engineering Science, v.40, p.1321-54, 1985
- LARA, S.R. **Tecnologia geral de aplicação de carragena**. In: SIMPÓSIO SOBRE HIDROCOLÓIDES, Campinas, 1991. Anais. p.22-50. Campinas: ITAL, 1993.
- LAU, P. S.; TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. W., **Effect of carrageenan immobilization on the physiological. ACTIVITIES**. Bioresource Technology 63, 1998.
- LENG, Y.; ZHENG, P.; SUN, Z. H., **Continuous production of L-phenylalanine from phenylpyruvic acid and L-aspartic acid by immobilized recombinant *Escherichia coli* SW0209-52**. Process Biochemistry, v.41, p.1669-1672, 2006.
- LIMA, M. N., **Estudo da imobilização de células *Saccharomyces Cerevisiae* em bagaço de caju – Avaliação de diferentes tratamentos**. TCC (Graduação) – Curso de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, 2019.
- LIMA, R. B., **Avaliação de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos formadores de flocos em açúcar cristal branco**. Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. USP- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2017.
- LOTUMOLO, M. B., **Estudo do perfil do consumidor de açúcar mascavo**. Trabalho Final de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Agrônômica – CCA – UFSCar para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo, 2022.

- MATOS, T. T. S., **Novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e híbridos entre *S. cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* para a produção de cerveja, cachaça e vinho.** Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Microbiologia, 2021.
- MINOSSO, N.; ADAMANTE, D., **Avaliação da viscosidade de carragenas comerciais.** Trabalho de conclusão de curso, apresentado como requisito parcial para a obtenção do Grau de Tecnólogo, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira, 2012.
- MISHRA, A.; SHARMA, A. K.; SHARMA, S.; BAGAI, R.; MATHUR, A. S.; GUPTA, R. P.; TULI, D. K. **Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor.** Renewable Energy, v. 98, p. 57–63, 2016.
- NIAKEDO, P. H. L. N.; AMARA, F.F.; PENNA, A. L. B. **Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragena e guar.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 40, n. 3., 2004.
- NIGAM, J. N., **Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells.** Journal of Biotechnology, v.80, p.189- 193, 2000.
- NUNES, M. C.; BATISTA, P.; RAYMUNDO, A.; ALVES, M. M.; SOUZA, I. **Vegetable proteins and Milk puddings. Colloides and surfaces B: Biointerfaces,** p. 21-29, 2003.
- OLIVEIRA, M. A. **Produção de cerveja de baixo teor alcoólico utilizando leveduras imobilizadas em biopolímero.** Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes, 2011.
- OLIVEIRA, M. E.A.S., **Avaliação das propriedades físicas e efeito prebiótico *in vitro* de carragena submetida ao processo de extrusão termoplástica.** Dissertação de mestrado da Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.
- ORTIZ, S. **Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio com nanopartículas magnéticas.** Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Florianópolis, 2017.
- PLANO DE DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA BRASILEIRA - 2015/2020. Disponível em: <http://seafoodbrasil.com.br/wp-content/uploads/2015/09/Plano_de_DesenvolvimentodaAquicultura-2015-2020.pdf> Acesso em: 27 de out. 2020.

- PRADO-FERNÁNDEZ, J. A, RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ; TOJO, E.; ANDRADE, J. M., **Quantitation of k-, i-and λ-carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression**. *Analytica Chemical Acta*, v.480, p.23-37, 2003.
- PRAMANIK, S; MCEVOY, J. SIRIPATTANAKUL, S; KHAN, E. **Effects of cell entrapment on nucleic acid content and microbial diversity of mixed cultures in biological wastewater treatment**. *Bioresource Technology* 102, 2011.
- REVISTA INTERNET TÉCNICA DO VINHO. **Coloração com azul-de-metileno**. Disponível em: <<https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto14401-01-1.pdf>> Acesso em 12 de dezembro de 2022.
- RÓS, R. R., **Caracterização química, físico-química, higiênico-sanitária e sensorial de açúcar mascavo produzido por sistemas convencional e orgânico**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Câmpus Medianeira, como parte dos requisitos para a conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos. MEDIANEIRA, 2019.
- SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M.; SUTARIYA, V. B., **Stability improvement of alpha-amylase entrapped in kappa-carrageenan beads: physicochemical characterization and optimization using composite index**. *International Journal of Pharmarceutical Sciences*. V. 312, p.1–14, 2006.
- SANTOS, A. M., **Estudo da influência de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. Universidade Federal de Alagoas. Maceió – AL, 2008
- SANTOS, F. A. **Eficiência de remoção de nitrato e amônia de efluente secundário com microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada em esferas de alginato de cálcio**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química, do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. PONTA GROSSA, 2020.
- SANTOS, F. P.; BRUNIERA, L. B.; GARCIA, C. E. R., **Carragena: uma visão ambiental**. *Revista Terra e Cultura*. No 47, Ano 24, 2008.
- SANTOS, L. G. M. C. **Criação, gestão e valoração de ativos intangíveis: um estudo de caso da marca açúcar cristal caeté**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Propriedade Intelectual e Transferência de Tecnologia para Inovação da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial do grau de Mestre em Propriedade Intelectual e Transferência de Tecnologia para Inovação, 2019.
- SCHAFRANSKI, K., **Extração e caracterização de compostos fenólicos de folhas de amoreira preta (*Morus Nigra* L.) e encapsulamento em esferas de alginato**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. PONTA GROSSA, 2019.

- SHARMA, G.; KHOSLA, A.; KUMAR, A.; KAUSHAL, N.; SHARMA, S.; NAUSHAD, M.; VO, D.; IQBAL, J.; STADLER, F. A. **comprehensive review on the removal of noxious pollutants using carrageenan based advanced adsorbents**, 2022.
- SILVA, R. O.; FREITAS, F. J. R.; FREITAS, J. C. R. **D-Glicose, uma Biomolécula Fascinante: História, Propriedades, Produção e Aplicação**. ev. Virtual Quim., 2018, 10 (4), 875-891,2018.
- SOUZA, E.A. **Produção de 1,3-propanodiol em biorreatores com células imobilizadas de *Klebsiella Pneumoniae* blh-1 utilizando glicerol residual proveniente da produção de biodiesel**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, 2013.
- STARTSE. **Mercado de algas, sustentável para alimentos e cosméticos, será de US\$ 45 bilhões**. Disponível em: <<https://www.startse.com/noticia/startups/mercado-de-algas-sustentavel-para-alimentos-e-cosmeticos-sera-de-us-45-bilhoes>>. Acessado: 20 de fev. 2020.
- SYED, K. H. G.; SAPHWAN, A. A.; GLYN, O. P., **Hydrogels: Methods of Preparation, Chacaracteristation and Applications, in: Progress in Molecular and Environmental Bioengineering -From Analysis and Modeling to Technology Application**. Ed. InTech Europe, 2011.
- TAKO, M.; TAMAKI, Y.; TERUYA,T.; TAKEDA, Y. **The Principles of Starch Gelatization and Retrogradation**. Food and Nutrition Sciences, v.5, p. 280-291, 2014.
- UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”). **Contagem de células de leveduras em câmara de Neubauer**. Instituto de Biociencias. Rio Claro. Disponível em: <https://ib.rc.unesp.br> > Acesso em 12 de dezembro de 2022.
- VILLANUEVA, R. D.; MONTANÕ, M. N. E., **Fine chemical structure of carrageenan from the the commercially cultivated *Kappaphycus striatum* (sacol variety) (*Solieriaceae,Gigartinales, Rhodophyta*)**. Journal Phycology, p. 513-518, 2003.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Massas de carragena e de cloreto de potássio utilizadas para a síntese de esferas de carragena

A Tabela 9 apresenta as diversas massas de carragena e de cloreto de potássio testadas nos experimentos de síntese de esferas de esferas. As massas de carragena foram solubilizadas em 100 mL água e a massa de cloreto de potássio foi solubilizada em 40 mL água.

Tabela 9. Massa de carragena e de cloreto de potássio testadas nos experimentos de síntese de esferas de esferas.

Carragena (g)	Cloreto de Potássio (g)
2,50	0,80
2,38	0,84
2,27	0,88
2,17	0,92
2,08	0,96
2,00	1,0
1,92	1,04
1,85	1,08
1,79	1,12
1,72	1,16
1,67	1,2
1,61	1,24
1,56	1,28
1,52	1,32
1,47	1,36
1,43	1,40
1,39	1,44
1,35	1,48
1,32	1,52
1,28	1,56
1,25	1,60
1,22	1,64
1,19	1,68
1,16	1,72
1,14	1,76
1,11	1,80
1,09	1,84
1,06	1,88
1,04	1,92
1,02	1,96
1,00	2,0

0,98	2,04
0,96	2,08
0,94	2,12
0,93	2,16
0,91	2,20
0,89	2,24
0,88	2,28
0,86	2,32
0,85	2,36
0,83	2,40
0,82	2,44
0,81	2,48
0,79	2,52
0,78	2,56
0,77	2,60
