

ESCOLA TÉCNICA ESTADUAL PROF. ARMANDO JOSÉ  
FARINAZZO  
CENTRO PAULA SOUZA

Bruna de Oliveira Severino  
Guilherme Augusto da Silva Silvério  
Mauro Augusto de Godoy  
Paulo Ricardo Rodrigues dos Santos  
Thainan Carlos Silva Gambi

ESTUDO PARA VIABILIZAR O CONGELAMENTO DE  
LEVEDURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* A PARTIR DA  
GLICERINA E VITAMINA C

Fernandópolis  
2019

Bruna de Oliveira Severino  
Guilherme Augusto da Silva Silvério  
Mauro Augusto de Godoy  
Paulo Ricardo Rodrigues dos Santos  
Thainan Carlos Silva Gambi

ESTUDO PARA VIABILIZAR O CONGELAMENTO DE  
LEVEDURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* A PARTIR DA  
GLICERINA E VITAMINA C

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como exigência parcial  
para obtenção da Habilitação  
Profissional Técnica de Nível Médio  
de Técnico em Açúcar e Álcool, no  
Eixo Tecnológico de Setor de  
Produção Industrial, à Escola  
Técnica Estadual Professor  
Armando José Farinazzo, sob  
orientação do Professor Me. Ricardo  
Henrique Del Grossi.

Fernandópolis  
2019

Bruna de Oliveira Severino  
Guilherme Augusto da Silva Silvério  
Mauro Augusto de Godoy  
Paulo Ricardo Rodrigues dos Santos  
Thainan Carlos Silva Gambi

ESTUDO PARA VIABILIZAR O CONGELAMENTO DE  
LEVEDURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* A PARTIR DA  
GLICERINA E VITAMINA C

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como exigência parcial  
para obtenção da Habilitação  
Profissional Técnica de Nível Médio  
de Técnico em Açúcar e Álcool, no  
Eixo Tecnológico de Setor de  
Produção Industrial, à Escola  
Técnica Estadual Professor  
Armando José Farinazzo, sob  
orientação do Professor Me. Ricardo  
Henrique Del Grossi.

Examinadores:

---

Ricardo Henrique Del Grossi

---

Midian Nikel Alves de Souza

---

Joel Gouveia Baptista

Fernandópolis  
2019

## DEDICATÓRIA

Agradecemos ao professor Ricardo Henrique Del Grossi por não ter desistido do nosso grupo, quando tudo parecia estar perdido.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente queremos agradecer a Deus, por ter dado forças para superar nossas dificuldades para alcançar nossos objetivos.

Agradecer também aos nossos professores por toda a ajuda, paciência, compreensão que nos ajudaram a tornar possível este sonho tão importante.

Agradecemos aos nossos amigos pelo incentivo e grande ajuda com fornecimento para material à realização deste trabalho

Agradecemos a todos por cada apoio e momentos compartilhados

## EPÍGRAFE

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”  
Winston Churchill

# ESTUDO PARA VIABILIZAR O CONGELAMENTO DE LEVEDURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* A PARTIR DA GLICERINA E VITAMINA C

Bruna de Oliveira Severino  
Guilherme Augusto da Silva Silvério  
Mauro Augusto de Godoy  
Paulo Ricardo Rodrigues dos Santos  
Thainan Carlos Silva Gambi

**RESUMO:** Uma das maiores preocupações nas usinas hoje em dia é a utilização de seus subprodutos de forma que gere renda para a empresa e como forma sustentável de utilização de seus resíduos. A levedura é um destes, que no final da safra é feito o descarte da mesma, porém esse descarte é feito de maneira incorreta, o resíduo pode contaminar o solo e rios próximos, e atualmente é mais comum ela ser utilizada como fabricação de ração animal. No presente trabalho foram desenvolvidos métodos variados de congelar as leveduras e o mais viável foi utilizando glicerina e vitamina C, a glicerina que apresenta características de conservação e preservação das células e a vitamina C contribui com proteção na célula e na redução a suscetibilidade a infecções. Com isso, foi feito as diluições e contagem das leveduras que apresentaram 65% de viabilidade e após isso acrescentamos compostos para o congelamento. Após três semanas de congelamento foi feita outra contagem de viabilidade, e em uma das dosagens foi apresentado resultados de viabilidade de 48%.

**Palavras-chave:** Levedura. Vitamina C. Viabilidade. Células. Glicerina.

**ABSTRACT:** One of the biggest concerns in mills today is the use of their by-products in a way that generates income for business and as a sustainable way to use their waste. Yeast is one of these, which at the end of the harvest is discarded, but this is improperly disposed, the residue can contaminate the soil and nearby rivers, and nowadays it is more commonly used as animal feed manufacturing. . In the present work, various methods of freezing yeasts were developed and the most viable was using glycerin and vitamin C, glycerin that presents cell preservation and preservation characteristics and vitamin C contributes to cell protection and reduced susceptibility to infections. Thus, the dosages and counting of yeasts that showed 65% of viability were made and after that we added compounds for freezing. After three weeks of freezing another viability count was made, and in one of them 48% viability results were presented.

**Keywords:** Yeast. Vitamin C. Viability. Cells. Glycerin.

## **1. INTRODUÇÃO**

Atualmente, nas Indústrias Sucroalcooleiras ocorrem problemas com gastos desnecessários na compra de levedura durante a entressafra. A levedura é um tipo de fungo, são também organismos unicelulares que não fazem fotossíntese e na maioria o processo reprodutivo é de forma assexuada. A espécie mais comum é *Saccharomyces cerevisiae*, pois possui uma melhor fermentação durante o processo. (PAULA, 2012)

A fermentação alcoólica é um processo biológico no quais açúcares como a glicose, frutose e sacarose são convertidos em energia celular com produção de etanol e dióxido de carbono como resíduos metabólicos. A levedura é importante nesse processo, pois elas quebram a molécula de glicose para produzir energia para sua célula, nesse processo são formados gás carbônico e álcool, favorecendo a produção de bebidas alcoólicas.

Durante o processo de fermentação alcoólica a levedura sofre com o estresse, pois tem que usar muito da sua capacidade para produzir o álcool, com isso ela é mandada para cuba de tratamento onde ela é alimentada e recuperada para voltar ao processo.

Sendo a reprodução assexuada, com o congelamento é esperado que ela pudesse “adormecer” de forma que não perca a viabilidade, com isso a proposta está em usar a água previamente congelada com glicerina e Vitamina C para que esta possa ser alimentada e não perder suas atividades ativas.

Com a glicerina, que contém emoliente, a levedura não irá se desidratar. Já com a Vitamina C é esperado que esta mantivesse um nível de estresse baixo.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1. CITOLOGIA DO REINO FUNGI**

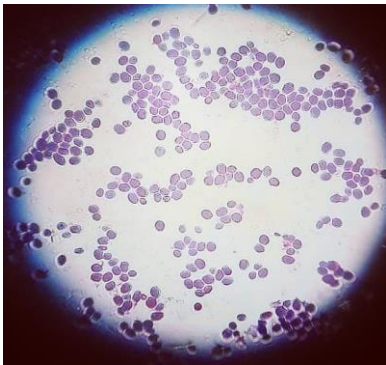


Os fungos apresentam características próprias que se diferenciam das plantas, tais essas diferenças seriam a não presença de celulose na parede celular, e também não sintetizam a clorofila.

Como a levedura faz parte do Reino Fungi, elas são organismos unicelulares que geralmente encontra-se em habitat úmido e rico em matéria orgânica.

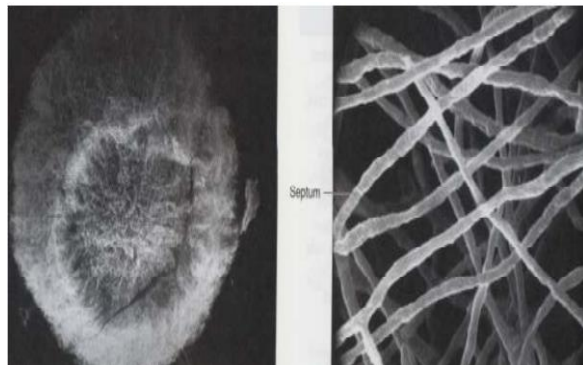
Os fungos podem se diferenciar por suas estruturas, um exemplo é a levedura que possui uma forma oval ou esférica, que facilita na sua identificação quando observada em microscópicos, como mostra a imagem abaixo.

Figura 1 – Levedura



Fonte: Biologiarepost, 2019

Figura 2 – Outros Fungos



Fonte: Prof.<sup>a</sup> Márcia G. Perdoncini –  
Microbiologia Fungos

### 2.1.1. LEVEDURA

As leveduras são fungos unicelulares que na maioria das vezes se reproduzem de forma assexuada por brotamentos, consiste em uma célula mãe que se divide em duas, onde uma delas será a célula filha que ficará idêntica à outra parte, por isso na maioria das vezes é feito a reprodução das leveduras somente com fungos pré-selecionados.

Na maioria das indústrias que utilizam a levedura, a espécie mais usada é o da *Saccharomyces Cerevisiae* onde sua fermentação é mais eficiente em comparação às outras espécies. Industrialmente, apresentam os seguintes pontos de interesse, são agentes de fermentação alcoólica, na produção do álcool industrial e todas as bebidas alcoólicas destiladas ou não destiladas, também são utilizadas na panificação e são importantes fontes de proteína. (JÚNIOR, 2012)

As leveduras são encontradas na natureza, onde podem ser observadas de forma comum no solo, na superfície de órgãos dos vegetais, principalmente encontradas em flores e frutos, também no trato intestinal de animais, e em líquidos açucarados.

As leveduras vivem em locais com presença de matéria orgânica ou como parasitas em outros seres vivos. Podem inclusive, parasitar os seres humanos, provocando doenças. A manifestação mais importante da infecção da levedura tipo *Saccharomyces* é a fungemia, que clinicamente pode ser indissociável da infecção por *Cândida*, inclusive com descrições de presença de coriorretinite (que é um processo inflamatório que envolve o trato uveal do olho) e as lesões esofagianas (que são os vasos sanguíneos dilatados e tortuosos que se formam na parede do órgão, e podem ser graves, pois à medida que se tornam maiores, apresentam risco de se romperem e causarem um sério sangramento).

### **2.1.2. ALIMENTAÇÃO**

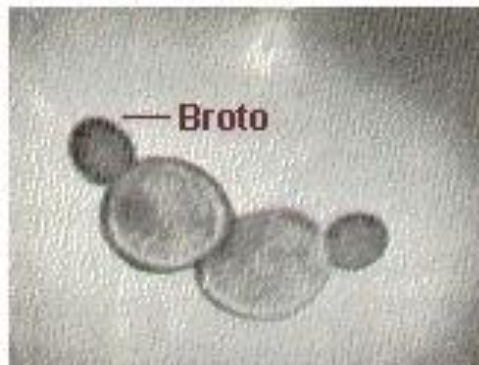
Os fungos se alimentam através da absorção de nutrientes presentes no solo, sendo chamados de heterotróficos. A alimentação ocorre através da liberação de enzimas digestivas pelo fungo no solo. Essas enzimas, chamadas de exoenzimas, agem digerindo as substâncias orgânicas presentes no solo para que o fungo possa absorver apenas os produtos dessa digestão. Como os processos digestivos ocorrem fora do organismo, a digestão é conhecida como digestão extracorpórea.

Os fungos absorvem oxigênio por oxidação da glicose durante o processo de respiração celular. As leveduras crescem em pH em torno de 5 e 6, mas podem haver uma variação no pH, onde fungos filamentosos crescem em pH de 1,5 a 11, porém as leveduras não aceitam o meio alcalino. Além de não aceitar o meio alcalino, a temperatura ideal dos fungos é entre 22°C e 30°C em grande maioria, mas já existem espécies que possuem adaptação para se desenvolver em temperaturas baixas ou altas.

### 2.1.3. REPRODUÇÃO

A reprodução das leveduras ocorre de maneira assexuada, através de um processo de brotamento. Neste processo, se desenvolve uma pequena saliência na superfície da célula de levedura mãe chamada de broto ou célula filha, que posteriormente se transformará numa nova célula idêntica a levedura inicial.

Figura 3 – Brotamento da Levedura



Fonte: BiologiaRepost

### 2.2. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica já era conhecida há muito tempo atrás em vinhos e em fabricação de pães, é um processo antigo que é usado até os

dias de hoje e é muito presente no nosso dia a dia, também nas usinas de álcool onde ocorre a transformação de glicose e frutose em álcool.

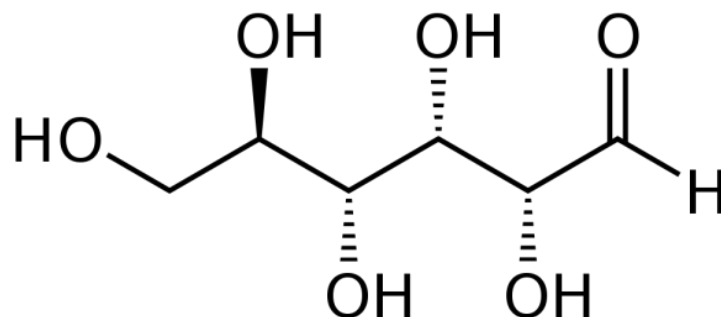
O seu processo é a anaeróbica, realizada principalmente pelas leveduras que são fungos unicelulares, anaeróbicos facultativos que na presença de oxigênio elas fazem a respiração celular, já com a sua ausência é feita a fermentação.

O processo anaeróbico ocorre da seguinte maneira, a levedura faz a quebra da molécula fornecendo energia para si em forma de ATP (trifosfato de adenosina) o saldo energético desse processo 2ATP inferior a respiração celular, e esse consumo é dado para ser ativada e a molécula sofrerá algumas reações até se dividir em duas moléculas de ácido pirúvico e é feita a descarboxilação até ser transformada em álcool etílico ou etanol.

### 2.2.1. GLICOSE

A glicose é um monossacarídeo e é um carboidrato muito importante na biologia. As células como forma de energia, principal produto da fotossíntese e inicia a respiração celular em seres procariontes e eucariontes. (MORAES, 2011)

Figura 4 – Fórmula Estrutural da Glicose

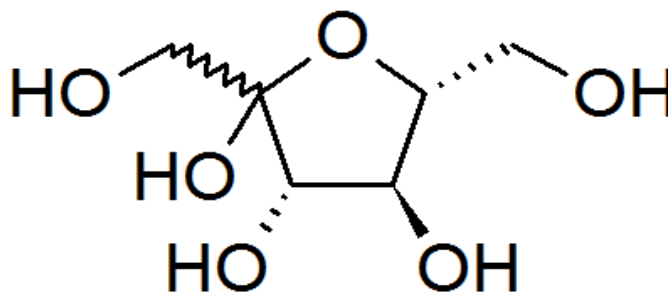


Fonte: (Nascimento.P. 2017)

### 2.2.2. FRUTOSE

A frutose é um monossacarídeo com os carbonos dispostos em anel, encontrado normalmente em frutas, ela também pode ser anaerobicamente fermentada por fungos ou por bactérias. As enzimas dos fungos convertem o açúcar (glicose ou frutose) a etanol e dióxido de carbono. Esse dióxido de carbono que é liberado na fermentação irá permanecer dissolvido na água, onde alcançará o equilíbrio com o ácido carbônico e eles juntos produzirão a carbonatação nas bebidas fermentadas engarrafadas.

Figura 5 – Fórmula Estrutural da Frutose



Fonte: (Nascimento.P. 2017)

### 2.3. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO NAS USINAS DE ÁLCOOL

Após a recepção da cana, onde é feito a pesagem, o descarregamento, a lavagem ou não dela, após isso ela passa por um processo preparo onde vai ser picada, desfibrada e serão retirados os minérios presentes até chegar às moendas ou difusores.

O caldo passará por um tratamento para ser retirada às impurezas, após esse processo de purificação, chega a parte de fermentação onde será feito uma mistura do caldo com o fermento que quebrará a glicose e transformara ela em etanol e gás carbônico.

### **3. GLICERINA**

A glicerina ou glicerol é um composto atóxico e orgânico líquido, incolor, viscoso e possui um sabor adocicado. O glicerol está presente em todos os óleos e em gorduras de origem vegetal e animal. Atualmente a substância pode ter origem sintética sendo proveniente do petróleo.

A glicerina é produzida por vias fermentativas em processos pouco complexos. Com a produção de biodiesel aumentando, o processo de produção pode tomar o lugar da produção fermentativa.

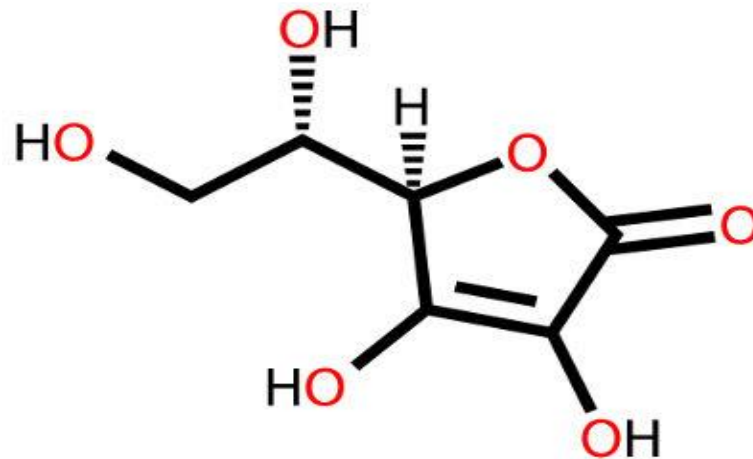
Com a fermentação anaeróbica da glicerina pode resultar na formação de etanol, a partir da formação desse composto, ela pode gerar novos compostos nocivos que são procurados para a produção por via microbiana.

### **4. VITAMINA C**

A Vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico ( $C_6H_8O_6$ ), é uma vitamina hidrossolúvel naturalmente presente em alimentos, como frutas e vegetais. Ela possui um papel crucial para a conservação e a minimização das perdas dos nutrientes tão sensível, e a sua falta pode causar gripes, resfriados e estresse.

Ela também traz benefícios às células no interior e exterior do corpo, a substância contida nela é um excelente antioxidante, que previne o envelhecimento das células. Entre seus benefícios, o que mais contribui para a levedura é a proteção das células e a redução à suscetibilidade a infecções.

Figura 6 – Fórmula Estrutural da Vitamina C



Fonte: (Dias. D. 2017) manualdaquimica.com

Existem diversas maneiras de se conseguir Vitamina C, onde as principais fontes podem ser consideradas o limão, a laranja, o morango, o brócolis, o espinafre e até comprimidos efervescentes.

Segundo Dr. Gabriel Azzini, com a ajuda da Vitamina C podemos ter o controle da pressão arterial, causando o relaxamento dos vasos sanguíneos, doenças cardíacas, diminuição do ácido úrico e ajuda na deficiência de ferro no organismo.

## 5. METODOLOGIA

Nos primeiros testes foi utilizado acetato de sódio, onde o mesmo teria um congelamento instantâneo quando alguma substância sólida entrasse em contato com ele, porém não foi viável, pois sua temperatura aumentava drasticamente ao se solidificar e isso prejudicaria a levedura.

Após isso, foi feito estudos de métodos de congelamento de células a partir do nitrogênio líquido, pois como o acetato de sódio também teria um congelamento instantâneo, porém possui um alto custo no mercado e esse método não foi possível realizar os testes de determinação de viabilidade.

Com isso, foi pesquisado um método usando glicerina e vitamina C, que é um método muito utilizado para o congelamento de leveduras de cerveja. Assim, desse modo desenvolveu-se um método onde primeiramente foi pipetado 1mL de papaína em um tubo de ensaio, após isso colocou-se 25mL da amostra e a agitou por 5 minutos. Após isso, pegou-se essa amostra do béquer a jogou em 100mL de eritrosina e o agitou. Feito isso passou essa amostra para lâmina, colocando a lamínula e pingou-se uma gota de óleo de imersão, e foram contados os 25 quadrantes.

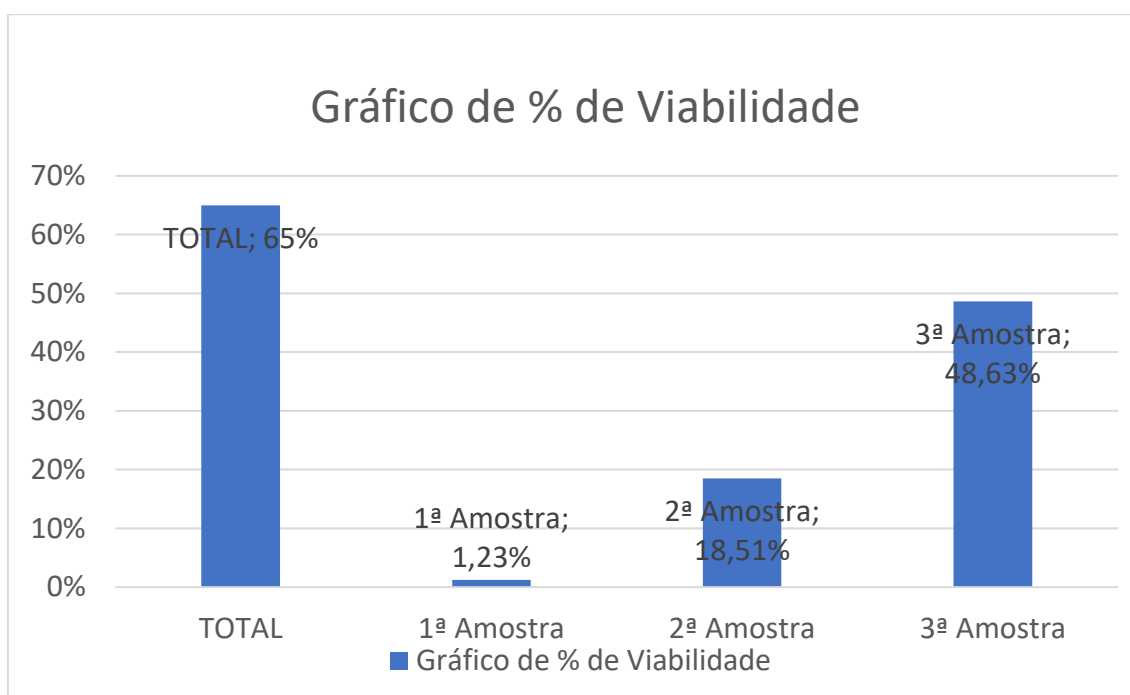
## 6. DESENVOLVIMENTO

Pegou-se a amostra de levedura doada por uma usina da região, foi feito a contagem celular e nela apresentou 68% de viabilidade, após isso separou-se em três béquer com proporções de 100mL, no 1º colocou-se 50mL de levedura, 40 de glicerina e 10mL de água destilada, no 2º foi aumentado a dosagem de levedura para 70mL com 30mL de glicerina e não foi posto água destilada, no 3º colocou-se 60mL de levedura, 30mL de glicerina e 10mL de água destilada. Após isso, colocou-se os béquer em um freezer de geladeira, aguardou-se 3 semanas e foram retirados do freezer, após a retirada, foi feito a contagem para viabilizá-las e apresentou os seguintes resultados de viabilidade, a 1ª amostra apresentou 1,23%, a 2ª apresentou 18,51% e a 3ª apresentou 48,63%, sendo a maior viabilidade obtida.

<b>Amostras</b>	<b>Dosagens</b>
1ª Amostra	50mL de Levedura 40mL de Glicerina 10mL de Água destilada
2ª Amostra	70mL de Levedura 30mL de Glicerina
3ª Amostra	60mL de Levedura 30mL de Glicerina 10mL de Água destilada



## Gráfico 1 – Viabilidade Celular das Amostras Preparadas



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que após as análises nas três amostras feitas, vimos que uma delas apresentou 48% de viabilidade o melhor valor alcançado, mesmo parecendo ser um valor baixo sua viabilidade já apresentava 65% de viabilidade. Notamos que nas amostras que apresentavam água teve viabilidade menor. Portanto, o ideal a ser feito era retirar a água das soluções e fazer novas dosagens com maior índice de glicerina e vitamina C para apresentar um valor maior e mais viável.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARDOSO, M. FRUTOSE. Disponível em <[www.infoescola.com/bioquimica/frutose/](http://www.infoescola.com/bioquimica/frutose/)>. Acesso em 17 set.2019

CONGELAMENTO DE LEVEDURA. Disponível em <[www.homebrewtalk.com.br/threads/insumos-para-congelamento-de-levedura.409923/](http://www.homebrewtalk.com.br/threads/insumos-para-congelamento-de-levedura.409923/)>. Acesso em 03 set. 2019

CUNHA, S. MICROORGANISMOS: LEVEDURAS. Disponível em <<https://little-monsters-espaa.blogspot.com/2010/11/leveduras.html>>. Acesso em 03 set. 2019.

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA. Disponível em <[www.sobiologia.com.br/conteudos/bioquimica/bioquimica3\\_2.php](http://www.sobiologia.com.br/conteudos/bioquimica/bioquimica3_2.php)>. Acesso em 10 set. 2019.

FERMENTAÇÃO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA. Disponível em <<https://sasofyp.wordpress.com/producao-de-alimentos-e-sustentabilidade/microbiologia-e-industria-alimentar/fermentacao-e-atividade-enzimatica/>>. Acesso em 10 set. 2019.

FRUTOSE. Disponível em <[pt.wikipedia.org/wiki/Frutose](http://pt.wikipedia.org/wiki/Frutose)>. Acesso em 17 set. 2019.

GLICERINA-BENEFÍCIOS. Disponível em <[www.minhavidacom.br/beleza/tudo-sobre/33653-glicerina](http://www.minhavidacom.br/beleza/tudo-sobre/33653-glicerina)>. Acesso em 22 out. 2019.

LEVEDURAS. Disponível em <[www.todamateria.com.br/leveduras/](http://www.todamateria.com.br/leveduras/)>. Acesso em 27 ago. 2019.

LEVEDURA-REINO FUNGI. Disponível em <<https://www.infoescola.com/reino-fungi/levedura/>>. Acesso em: 27 ago. 2019.

MORAES, Paula Louredo. "Glicose"; Brasil Escola. Disponível em <<https://brasilescola.uol.com.br/saude/glicose.htm>>. Acesso em 22 out. 2019

NASCIMENTO, P. FERMENTAÇÃO. Disponível em <[www.infoescola.com/biologia/fermentacao/](http://www.infoescola.com/biologia/fermentacao/)>. Acesso em 10 set. 2019.

NASCIMENTO, P. GLICOSE. Disponível em <[www.infoescola.com/bioquimica/glicose/](http://www.infoescola.com/bioquimica/glicose/)>. Acesso em 17 set. 2019.

PAULA, C. Química Técnica: LEVEDURAS E BOLORES. Disponível em <[quimicatecnica.blogspot.com/2012/05/fungos.html](http://quimicatecnica.blogspot.com/2012/05/fungos.html)>. Acesso em 27 ago. 2019.

VIABILIDADE CELULAR DE SACCHAROMYCE CERIVISIAE. Disponível em <[www.researchgate.net/profile/Rosana\\_Freguglia/publication/262612222\\_Cellul ar\\_viability\\_of\\_Saccharomyces\\_cerevisiae\\_in\\_mixed\\_culture\\_with\\_Lactobacillus\\_fermentum/links/565cb37b08aeafc2aac71a1d.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Rosana_Freguglia/publication/262612222_Cellul ar_viability_of_Saccharomyces_cerevisiae_in_mixed_culture_with_Lactobacillus_fermentum/links/565cb37b08aeafc2aac71a1d.pdf)>. Acesso em 03 set. 2019.

VITAMINA C. Disponível em <[www.gsuplementos.com.br/conteudo/para-que-serve/vitamina-c-para-que-serve/](http://www.gsuplementos.com.br/conteudo/para-que-serve/vitamina-c-para-que-serve/)>. Acesso em 29 out. 2019.

VITAMINA C-BENEFÍCIOS. Disponível em  
<[www.youtube.com/watch?v=JA7U1xxd3aU](http://www.youtube.com/watch?v=JA7U1xxd3aU)>. Acesso em 12 nov. 2019